

**Chromosomale Imbalancen
differenzierter Schilddrüsenkarzinome im
Kindes- und Jugendalter**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Kirstin Beer, geb. Vollrath
geboren am 13.09.1980 in Friedrichroda**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Uwe Claussen**
- 2. Prof. Dr. Felix Zintl**
- 3. Prof. Dr. Erich Gebhart**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.04.2007

Abkürzungsverzeichnis

a-dig-Rhodamin	Anti-Digoxigenin-Rhodamin
Aqua bidest.	zweimal destilliertes Wasser
Aqua dest.	einmal destilliertes Wasser
ARHI	<i>ras homolog gene family, member 1</i>
Avidin-FITC	Avidin-Fluoresceinisothiocyanat
bp	Basenpaar
CCD – Kamera	<i>charge-couple-device</i> -Kamera (gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
CCR	komplette Remission, <i>complete continuous remission</i>
CGH	Komparative Genomische Hybridisierung, <i>comparative genomic hybridization</i>
DAPI	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOP	Degenerierter Oligonukleotidprimer
DTC	Differenziertes Schilddrüsenkarzinom
DTT	1,4 - Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERBB2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (avian)</i>
FA	Follikuläres Schilddrüsenadenom
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
HE	Hämalaun-Eosin
KCL	Kaliumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

LOH	Verlust der Heterozygotie, <i>loss of heterozygosity</i>
Mb	Megabase
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
MET	Maligne Endokrine Tumoren
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NTRK1	<i>neutrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>
OT	Objektträger
p	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PKA	Proteinkinase Alpha
PRKAR1A	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha</i>
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
pTNM	postoperative histopathologische Klassifikation (T-Ausdehnung des Primärtumors; Fehlen bzw. Vorhandensein von N-regionären Lymphknotenmetastasen, M-Fernmetastasen)
ras	<i>rat sarcoma</i>
RECA	<i>recombination protein A</i>
RET	<i>RET-protooncogene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer, <i>standard saline citrate</i>
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
THRA	Thyroidhormonrezeptor Alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Maligne Endokrine Tumoren im Kindes- und Jugendalter	3
2.1.2 Neoplasien der Schilddrüse	3
2.1.3 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome (DTC)	4
2.2 Therapiestudie GPOH-MET-97	8
2.3 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) und ihre Bedeutung	9
3 Zielstellung der Arbeit	12
4 Material	13
4.1 Untersuchungsmaterial	13
4.2 Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten und die Chromosomenpräparation	14
4.3 Reagenzien für die Entparaffinierung und Färbung von Paraffinschnitten	14
4.4 Reagenzien für die DNA-Extraktion	15
4.5 Reagenzien für die Kernextraktion	16
4.6 Reagenzien für die Konzentrationsbestimmung mit der Tüpfelplatte	16
4.7 Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
4.7.1 Reagenzien für die DOP-PCR	17
4.7.2 Reagenzien für die Markierungs-PCR	17
4.8 Verwendete Antikörper, Nukleotide und Zentromersonden	18
4.9 Reagenzien für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	18
4.10 Medien, Lösungen, Puffer und Sonstiges	19
4.11 Geräte	20

5 Methoden	21
5.1 Herstellung zytogenetischer Präparate	21
5.1.1 Kultivierung von Lymphozyten	21
5.1.2 Chromosomenpräparation aus kultivierten Lymphozyten	21
5.1.3 Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer	23
5.1.4 DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe	23
5.1.5 DNA-Extraktion aus Blut	24
5.1.6 Kernextraktion aus Paraffinschnitten	24
5.2 Bestimmung der DNA-Menge mittels Photometer und Tüpfelplatte	25
5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
5.3.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-PCR)	27
5.3.2 Markierungs-PCR	30
5.4 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)	31
5.4.1 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	31
5.4.2 Vorbereitung der DNA-Sonden	32
5.4.3 In situ Hybridisierung	32
5.4.4 Detektion der DNA-Sonden	33
5.4.5 Mikroskopie und Auswertung	34
5.4.6 Methodische Besonderheiten	35
5.5 Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Interphase-FISH)	36
5.6 Statistische Auswertung	37
 6 Ergebnisse	 38
6.1 Auswertungsstrategie der CGH-Analyse	38
6.2 Chromosomale Imbalancen follikulärer Schilddrüsenkarzinome (FTC)	40
6.3 Chromosomale Imbalancen und klinische Merkmale der Patienten mit FTC	41
6.4 Chromosomale Imbalancen papillärer Schilddrüsenkarzinome (PTC)	44
6.5 Relevante klinische Merkmale der Patienten mit PTC	45
6.6 Zusammenhang zwischen Tumolvolumen, Diagnosealter und Anzahl der Aberrationen der PTC	48
6.7 Chromosomale Imbalancen in Tumoren unterschiedlicher Ausdehnung	48

6.8	Zuordnung chromosomaler Imbalancen zu Krankheitsstadien	50
6.9	Chromosomale Imbalancen in Beziehung zu radiotherapeutischer Vorbehandlung, aktuellem Krankheitszustand und Auftreten von Metastasen	54
6.10	Verifizierung der CGH-Ergebnisse mittels der Interphase-FISH-Analyse	57
6.11	Gemeinsame und unterschiedliche chromosomale Imbalancen von FTC und PTC	59
7	Diskussion	61
7.1	Methodische Aspekte der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)	61
7.2	Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC)	64
7.3	Papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC)	69
7.4	Vergleich der chromosomalen Imbalancen der Tumorentitäten FTC und PTC	76
8	Schlussfolgerungen	78
9	Literaturverzeichnis	80
10	Anhang	
	Danksagung	90
	Lebenslauf	92
	Ehrenwörtliche Erklärung	93

1 Zusammenfassung

Chromosomale Aberrationen von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen im Kindes- und Jugendalter sind bisher kaum bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für diese Tumorentitäten spezifische Chromatinzugewinne oder –verluste aufzuzeigen und zytogenetische Marker zu identifizieren, die mit klinischen Charakteristika der Tumoren korrelieren und bei der Therapiegestaltung und Prognoseermittlung hilfreich sein können.

Im Rahmen der GPOH-MET-97 Studie (Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie – Maligne Endokrine Tumoren) wurden mit der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) 6 follikuläre und 20 papilläre Schilddrüsenkarzinome von Kindern und Jugendlichen auf chromosmale Imbalancen untersucht.

Kindliche follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC) zeigen häufig wiederkehrende und damit für die untersuchte Patientengruppe charakteristische Aberrationen. Diese sind: +17q (100%), +17p (83%), +20q (67%). Eine Korrelation der zytogenetischen Veränderungen zu bestimmten klinischen Charakteristika der Erkrankung konnte nicht festgestellt werden.

Kindliche papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC) zeigen als wiederkehrende charakteristische Aberrationen: +17q (90%), +17p (80%), +15q (65%), +20q (50%). Zytogenetische Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf kindlicher PTC sind die Verluste 1p, 4q, 5q und 6q, die in einem signifikanten Zusammenhang zu dem Krankheitszustand der Patienten stehen ($p=0,022$; $p=0,005$; $p=0,022$; $p=0,004$). Darüber hinaus ist für Tumoren von Patienten mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf eine signifikant höhere mittlere Aberrationenzahl (7 vs. 4; $p=0,003$) charakteristisch.

Der Vergleich der chromosomalen Veränderungen kindlicher FTC und PTC liefert keinen sicheren Hinweis auf einen unterschiedlichen Pathogeneseweg beider Tumorentitäten.

Für kindliche PTC wurden aus klinischer Sicht bedeutsame zytogenetische Marker, die zur Prognosestellung herangezogen werden können, ermittelt. Sie bilden eine Grundlage für weitere Datensammlungen, die helfen können, prä- und postoperative Behandlungsentscheidungen zu erleichtern und zu verbessern.

2 Einleitung

Die zytogenetische Analyse von malignen Erkrankungen kann bei der Klärung verschiedener diagnostischer Fragestellungen hilfreich sein. Sie kann Informationen zur Festlegung der Dignität eines Tumors, zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Tumorsubtypen und zum Krankheitsverlauf und der postoperativen Prognose liefern. Zytogenetische Analysen hämatologischer Malignome haben in der Vergangenheit ein wiederkehrendes Muster struktureller und numerischer Chromosomenveränderungen enthüllt. Es konnte gezeigt werden, dass der Karyotyp bei bestimmten Leukämieformen mit den morphologischen Eigenschaften und dem klinischen Verhalten korreliert. Diese Tatsache macht die zytogenetische Analyse heute zu einem wertvollen Hilfsmittel in der Diagnostik und der Therapiewahl bei Patienten mit Leukämien und Lymphomen. Genetische Veränderungen und deren Korrelation zu klinischen und morphologischen Charakteristika wurden in den letzten zwei Jahrzehnten ebenso bei einer großen Zahl solider Tumoren erforscht (Mitelman et al., 1997). Mit der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) zeigten Kallioniemi et al. (1992) eine neue Methode, um chromosomale Imbalancen von soliden Tumoren, deren Kultivierung und Chromosomenpräparation schwierig ist, zu ermitteln. In der Folge wurden auf diese Weise bei einer Vielzahl von Malignomen klinisch relevante Chromosomenveränderungen entdeckt (Struski et al., 2002). Zum Beispiel assoziierten Hirai et al. (1999) den Zugewinn von 1q23 bei Neuroblastomen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer Therapieresistenz.

Bei Malignen Endokrinen Tumoren (MET) im Kindes- und Jugendalter sind Daten über Therapie, Verlauf und chromosomale Aberrationen jedoch immer noch rar. In der vorliegenden Arbeit wurden kindliche follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinome mit der CGH auf chromosomale Imbalancen untersucht. Die ermittelten Chromosomenstörungen liefern erste Hinweise auf zytogenetische Marker, die neben klinischen und morphologischen Daten (Diagnosealter, Tumorstadium, Tumorgroße) für die Therapiegestaltung und Prognoseermittlung dieser Tumorentitäten genutzt werden können.

2.1 Maligne Endokrine Tumoren im Kindes- und Jugendalter

Endokrine Tumoren sind in der Altersgruppe unter 18 Jahren sehr selten. Sie sind meistens (neuro)epithelialen Ursprungs und machen insgesamt schätzungsweise 4-5% aller benignen und malignen Neoplasien im Kindes- und Jugendalter aus (Chrousos, 1989). Zu den malignen endokrinen Tumoren (MET) werden folgende Entitäten gezählt: die malignen Keimzelltumoren, das Schilddrüsenkarzinom, das Nebenschilddrüsenkarzinom, das Nebennierenrindenkarzinom, das maligne Phäochromozytom, maligne Tumoren des endokrinen Pankreas, sowie Karzinoide, also Tumoren des „diffusen neuroendokrinen Systems“ (Riede et al., 1993).

Eine Reihe von Studien beschäftigt sich mit den für die Entstehung dieser Tumoren verantwortlichen Genen. So gilt zum Beispiel als sicher, dass eine Mutation des p53 – Tumorsuppressorgens und ein Rearrangement der chromosomalen Region 11p15.5, das assoziiert ist mit einer IGF II – Überexpression, für die Entwicklung von Nebennierenrindenkarzinomen verantwortlich sind (Reincke et al., 2000). Wichtige Gene, die man im Zusammenhang mit der Pathogenese von Schilddrüsenkarzinomen diskutiert, werden in den folgenden Kapiteln beschrieben (2.1.2; 2.1.3).

2.1.2 Neoplasien der Schilddrüse

Das Schilddrüsenkarzinom stellt das häufigste Karzinom im Kindes- und Jugendalter dar (Kaatsch et al., 1996). Dennoch treten nur 10% aller Schilddrüsenkarzinome bei Patienten vor dem 21. Lebensjahr auf (Desjardins et al., 1988). Die jährliche Inzidenz für das kindliche Schilddrüsenkarzinom (0-15 Jahre) liegt unter 1/1 Million (Stiller, 1994). Entsprechend der WHO-Klassifikation der malignen Schilddrüsentumoren lassen sich fünf histologische Subtypen epithelialen Ursprungs unterscheiden (Hedinger et al., 1989). Diese sind:

- das papilläre,
- das follikuläre,
- das medulläre,
- das undifferenzierte (anaplastische) Karzinom der Schilddrüse und
- das Schilddrüsenkarzinom anderer histologischer Spezifizierung.

Papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome werden als differenzierte Schilddrüsenkarzinome zusammengefasst. Sie sind die häufigsten Schilddrüsenneoplasien bei Patienten unter 18 Jahren (Chrousos, 1989). Im Allgemeinen zeichnen sich die differenzierten Schilddrüsenkarzinome durch eine gute Prognose aus (Studienprotokoll der GPOH-MET, 1997).

Das von den C-Zellen der Schilddrüse ausgehende medulläre Karzinom macht in der Altersgruppe unter 18 Jahren 5-10% aus (Chrousos, 1989). Es tritt häufig im Rahmen einer autosomal dominant erblichen Multiplen Endokrinen Neoplasie, dem so genannten MEN-Syndrom, auf (Telander und Moir, 1994). Sowohl der MEN Typ 2a, als auch der MEN Typ 2b liegen Rearrangements des RET-Protoonkogens auf Chromosom 10 zugrunde, so dass die molekularbiologische Früherkennung und die prophylaktische Thyroidektomie an Bedeutung zunimmt (Dralle et al., 1996). Die Prognose für das medulläre Schilddrüsenkarzinom ist nicht so günstig wie für die differenzierten Schilddrüsenkarzinome (Studienprotokoll der GPOH-MET, 1997).

Das anaplastische Karzinom der Schilddrüse hat eine sehr schlechte Prognose. Es stellt eine extreme Rarität dar (Studienprotokoll der GPOH-MET, 1997). Anaplastische Schilddrüsenkarzinome werden bei weniger als 1% der Patienten diagnostiziert (Chrousos, 1989).

Schilddrüsenkarzinome anderer histologischer Spezifizierung, zum Beispiel Spindelzellkarzinome, sind Karzinome mit histologischen Besonderheiten, die sehr selten auftreten und deshalb nicht als unabhängige Entitäten etabliert sind.

2.1.3 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome (DTC)

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom ist mit einem Anteil von circa 80% der dominierende histologische Subtyp der Schilddrüsenkarzinome. Die Angaben für das follikuläre Schilddrüsenkarzinom schwanken zwischen 3% (Goepfert et al., 1984) und 24% (Travagli et al., 1995). Die DTC werden in einem typischen Geschlechtsverhältnis von 2:1 bis 4:1 Mädchen zu Jungen je nach Studie diagnostiziert (Schlumberger et al., 1987; Travagli et al., 1995, Grigsby et al., 2002). Farahati et al. (1997) berichten von einer Zunahme der Mädchenwendigkeit beim papillären Schilddrüsenkarzinom während der Pubertät.

Als Auslöser des kindlichen Schilddrüsenkarzinoms spielt ionisierende Strahlung eine wichtige Rolle. Nach dem Reaktorunfall 1986 in Tschernobyl stieg die Zahl der

papillären Schilddrüsenkarzinome bei Kindern stark an (Beral und Reeves, 1992). Das Auftreten von Schilddrüsenkarzinomen als Zweitmalignom in Folge einer vorangegangenen Bestrahlung, vor allem beim Morbus Hodgkin, ist bekannt (Tucker et al., 1991).

Kinder und Jugendliche mit DTC sind durch ein fortgeschritteneres Tumorstadium und eine größere Anzahl von Lymphknoten- und Fernmetastasen als Erwachsene gekennzeichnet (Zimmerman, 1988; Travagli et al., 1995). Parlowsky et al. (1996) fanden bei Kindern mit papillärem Schilddrüsenkarzinom ein statistisch signifikant häufigeres Auftreten von Metastasen als bei Kindern mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom. In der Erwachsenenmedizin dagegen gilt das FTC als der aggressiver wachsende und metastasierungsfreudigere histologische Subtyp (Samaan et al., 1992). Trotz der oft frühen Metastasierung zeichnen sich die DTC im Kindesalter durch eine günstige Prognose aus. Diese Tatsache lässt einerseits auf wenig progrediente Tumortypen schließen, andererseits ein gutes Ansprechen auf die bei DTC angewendete Therapie und eine hohe Therapieverträglichkeit vermuten. In der Literatur sind klinisch-pathologische Studien, die sich mit den kindlichen Schilddrüsenkarzinomen befassen, immer noch selten (Winship und Rosvoll, 1970; Jocham et al., 1994; Travagli et al., 1995; Bucsky und Parlowsky, 1997). Bisher existierten keine einheitlichen Therapierichtlinien zur Behandlung des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms im Kindesalter. Die Radikalität der Thyroidektomie und die Indikationen für eine anschließende Radiojodtherapie sind umstritten (Goepfert et al., 1984).

Eine Reihe veröffentlichter Studien gibt Hinweis darauf, dass sich papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome entlang verschiedener Pathogenesewege entwickeln (Learoyd et al., 2000; Abbildung 1). Es wird diskutiert, dass das papilläre Schilddrüsenkarzinom de novo aus den normalen Follikelepithelzellen entsteht, wohingegen die Entwicklung des follikulären Schilddrüsenkarzinoms der Sequenz: normale Schilddrüse – Adenom – Karzinom folgt (Wynford-Thomas, 1994). Ob sich das undifferenzierte anaplastische Schilddrüsenkarzinom aus bereits bestehenden differenzierten Karzinomen oder aus normalen Schilddrüsenfollikelepithelzellen entwickelt, ist noch unklar (Learoyd et al., 2000). Unabhängig von dieser Diskussion, gilt es als sicher, dass die meisten Schilddrüsenkarzinome als ein Ergebnis multipler Mutationen in verschiedenen Genen entstehen (Learoyd et al., 2000). Eine

2 Einleitung

Zusammenfassung der im Zusammenhang mit der Pathogenese der Schilddrüsenneoplasien wichtigsten Gene zeigt Tabelle 1.

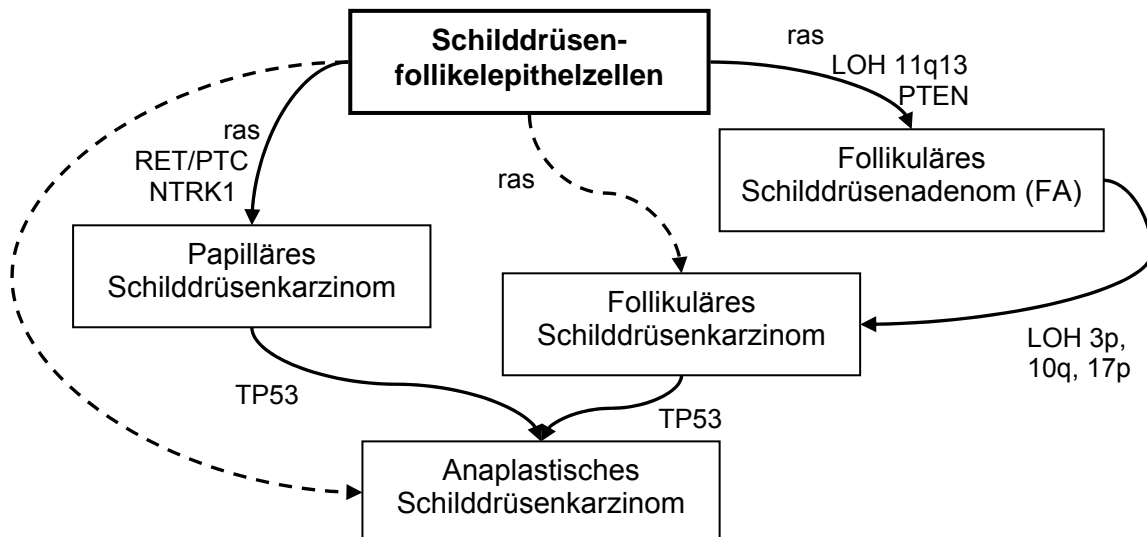


Abbildung 1: Mögliches genetisches Modell der Schilddrüsen-Tumorgenese (Learoyd et al., 2000; modifiziert)

Dargestellt sind die in der Literatur diskutierten Pathogenesewege der DTC. Danach entsteht das PTC de novo aus normalen Follikel­epithel­zellen, das FTC folgt der Sequenz normale Schilddrüse – Adenom – Karzinom und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom entwickelt sich entweder aus der normalen Schilddrüse oder aus bereits bestehenden DTC.

Tabelle 1: Wichtige Gene, die mit der Entstehung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen in Verbindung gebracht werden (Learoyd et al., 2000; modifiziert)

Tumortyp	Gen	Funktion	Bemerkung
Follikuläres Karzinom (FTC)	ras	- Proto-Onkogen, kodiert ein Signaltransduktionsprotein	- in FTC häufiger mutiert als in FA, Mutation ist ein frühes Ereignis in Schilddrüsentumorgenese
	PTEN	- Tumorsuppressorgen	- Mutation/Deletion in 25% der FA und in 6% der FTC
	LOH 3p, 17p, 10q TP53	- Tumorsuppressorgen, kodiert das p53 Protein (Zellzyklusregulator, induziert die Apoptose)	- einbezogen in Tumorprogression - Mutation wird mit dem Transformationsprozess zum anaplastischen Phänotyp assoziiert
Papilläres Karzinom (PTC)	ras	- Proto-Onkogen	- an der frühen Tumorentstehung beteiligt, häufiger bei Tumoren mit Metastasen
	RET/PTC NTRK1	RET und NTRK1 sind Proto-Onkogene, kodieren Membranrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität	- häufig aktiviert, Beziehung zu Strahlenbelastung und klinischem Verhalten - in einigen PTC aktiviert
	TP53	- Tumorsuppressorgen	- Mutation wird mit dem Transformationsprozess zum anaplastischen Phänotyp assoziiert

2.2 Therapiestudie GPOH-MET-97

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinome stammen von Kindern und Jugendlichen, die im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie GPOH-MET-97 (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie - Maligne Endokrine Tumoren) erfasst wurden.

In der Literatur sind die Daten zur Inzidenz und dem therapeutischen Vorgehen bei malignen endokrinen Tumoren im Alter unter 18 Jahren bisher sehr rar. Nur für die malignen Keimzelltumoren, eine sehr häufige Neoplasie in dieser Altersgruppe, gab es bereits eine erfolgreiche bundesweite Therapieoptimierungsstudie der GPOH, so dass mit dieser Erkrankung weitreichende Erfahrung besteht (Kaatsch et al., 1996).

Das Wissen über die Schilddrüsenkarzinome, die Phäochromozytome, die Nebennierenrindenkarzinome und die Karzinoide im Kindes- und Jugendalter stützte sich dagegen bisher auf einzelne Fallberichte und retrospektive Analysen (Jocham et al., 1994; Travagli et al., 1995). Aus diesem Grund hat die GPOH in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgemeinschaften 1997 eine interdisziplinäre, prospektive, multizentrische Therapiestudie beziehungsweise Therapieoptimierungsstudie für diese Erkrankungen initiiert. Die Ziele dieser Studie sind:

- eine möglichst vollständige deutschlandweite Erfassung aller Patienten mit MET unter 18 Jahren (Inzidenzermittlung),
- die Prognoseverbesserung bestimmter Entitäten,
- die Optimierung von Diagnostik, Therapie und Nachsorge und
- die Erforschung der Biologie maligner endokriner Tumoren im Kindesalter (Studienprotokoll der GPOH-MET-97).

Die Studie registriert alle Kinder und Jugendlichen unter 18 Jahren, bei denen ein Schilddrüsenkarzinom, Phäochromozytom, Nebennierenrindenkarzinom oder Karzinoid primär diagnostiziert wurde. Voraussetzung ist das Einverständnis des Sorgeberechtigten beziehungsweise des Patienten. Außerdem müssen der Studienleitung genügend auswertbare Daten des Patienten zur Verfügung stehen und es dürfen keine Begleiterkrankungen, die eine protokollgerechte Therapie ausschließen, vorliegen.

Das Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena ist in der GPOH-MET-97 Studie Referenzlabor für die zytogenetische Charakterisierung der Tumoren. Es ermittelt und evaluiert Chromosomenanomalien der malignen endokrinen Tumoren

und liefert so einen weiteren Parameter zur Subcharakterisierung und einer damit eventuell möglichen Therapieoptimierung.

2.3 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) und ihre Bedeutung

In Karzinomen findet man eine Anhäufung verschiedener Aberrationen der Gene, die Zellwachstum und Zelltod kontrollieren. Die Veränderungen entstehen unter anderem durch: Einzelbasenaustausche beziehungsweise Punktmutationen, Chromosomenaberrationen, wie Translokationen, Deletionen und Inversionen, und Genvervielfachungen. Die Erkennung nichtzufälliger, tumortypspezifischer Aberrationen ist ein wichtiger Bestandteil der Diagnose und Prognose hämatologischer Erkrankungen geworden.

Die Identifikation unbekannter wiederkehrender chromosomaler Aberrationen maligner Erkrankungen erfolgt meist anhand von Karyotypanalysen nach Chromosomenbänderung. Bei dieser Methode werden sich teilende Zellen benötigt. Die Chromosomenpräparation ist jedoch bei soliden Tumoren, insbesondere den MET, oft schwierig oder gar nicht möglich.

Die von Kallioniemi et al. 1992 beschriebene Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) ist eine Methode, die die Sensitivität und Spezifität der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit den Vorteilen der konventionellen Zytogenetik verbindet und eine Chromosomenpräparation aus dem Tumorgewebe nicht benötigt. Mit der CGH können unbekannte chromosomale Imbalancen des gesamten Genoms in nur einem Hybridisierungsexperiment aufgedeckt werden. Unterschiedlich markierte Test-DNA aus Tumorzellen des Patienten und Normal-DNA aus Lymphozyten eines gesunden Spenders werden gleichzeitig auf Objektträger mit Metaphaseplatten einer gesunden Person hybridisiert und mit verschiedenen Fluorochromen detektiert (Kallioniemi et al., 1992; Abbildung 2). Durch das unterschiedliche Fluoreszenzspektrum lassen sich Chromosomenbereiche erkennen, in denen die DNA-Sonden mit verschiedener Effizienz hybridisiert haben. Veränderungen des Intensitätsverhältnisses der beiden Fluorochrome entlang eines Chromosoms werden als Chromatinzugewinne oder –verluste interpretiert. In den Regionen mit unbalancierten Aberrationen können bisher unbekannte, für die Tumorentstehung oder –progression in Frage kommende Onkogene oder Tumorsuppressorgene identifiziert werden. Die Sensitivität der CGH ist jedoch auf

eine Mindestgröße der Aberrationen von 10-20 Mb beschränkt. Die quantitative Messung der Fluoreszenzintensitäten basiert auf einer digitalen Bildanalyse. Mit einer im Mikroskop integrierten CCD-Kamera werden circa 20 Metaphaseplatten aufgenommen und mit der entsprechenden Software statistisch ausgewertet.

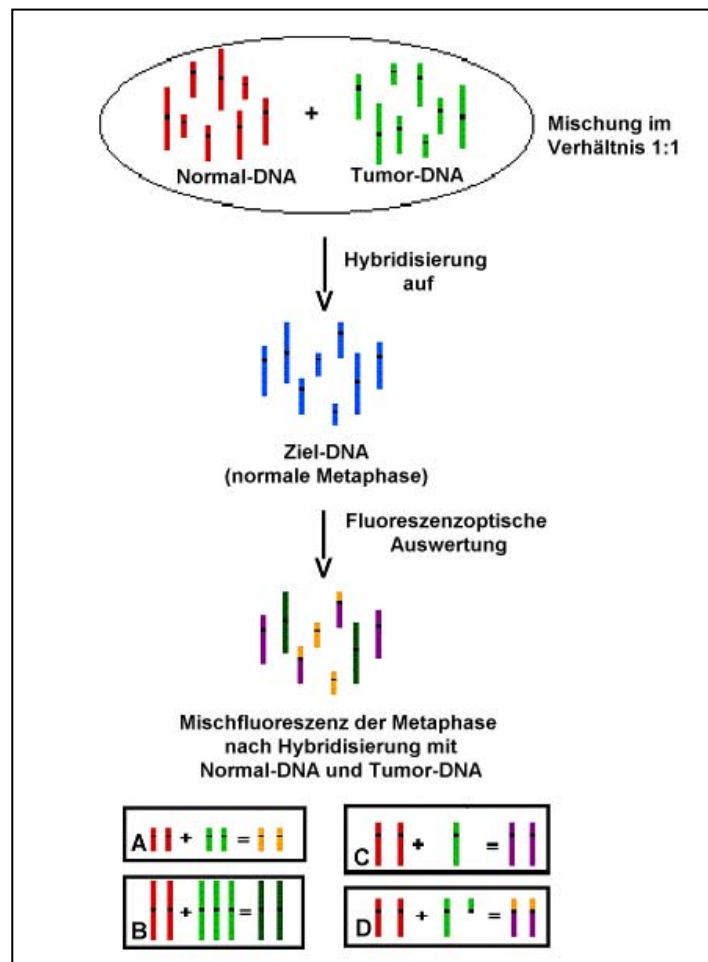


Abbildung 2: Prinzip der CGH (Haas, 1997; modifiziert)

- A: Normal-DNA und Tumor-DNA im Verhältnis 1:1, die Fluoreszenzintensitäten sind gleich
B: Trisomie der Tumor-DNA, Fluoreszenzintensität der Tumor-DNA überwiegt
C: Monosomie der Tumor-DNA, Fluoreszenzintensität der Normal-DNA überwiegt
D: Partielle Monosomie (q-Arm) der Tumor-DNA, Fluoreszenzintensität der Normal-DNA überwiegt nur im Bereich des q-Arms

Die von Speicher et al. (1993) beschriebene Kombination einer universellen DNA-Amplifikation mit der CGH zeigt die Möglichkeit auf, archivierte formalinfixierte und paraffineingebettete Tumorgewebe auf chromosomale Imbalancen zu untersuchen. Dadurch ist nicht nur die retrospektive Identifikation chromosomaler Aberrationen und die Suche nach Korrelationen zwischen zytogenetischen Untersuchungsergebnissen und klinischen Charakteristika der Tumoren erleichtert,

sondern auch die Möglichkeit der Erforschung der chromosomalen Veränderungen während der Tumorprogression gegeben (Ried et al., 1997).

Trotz der anerkannten Bedeutung der CGH bei der Ermittlung chromosomaler Imbalancen solider Tumoren, dürfen wichtige methodische Nachteile und Probleme nicht unerwähnt bleiben. Erwähnenswert sind die folgenden Schwachpunkte:

- Balancierte chromosomale Rearrangements und Ploidie-Veränderungen können mit der CGH nicht erkannt beziehungsweise fehlgedeutet werden.
- Durch das Abblocken repetitiver Sequenzen können perizentrische und heterochromatische Bereiche nicht beurteilt werden.
- Bei einem Anteil normaler Zellen im Tumorgewebe von mehr als 50% können Ratioveränderungen nicht zuverlässig erkannt werden.
- Die Heterogenität eines Gewebes bleibt unerkannt, da die CGH nur die durchschnittliche Veränderung der Kopienzahl eines Gewebes ermittelt.

Der CGH wird heute für die Diagnostik von chromosomalen Veränderungen solider Tumoren große Bedeutung zugesprochen. Zunehmend wird die klassische CGH durch eine auf der Microarray-Technologie basierende CGH ersetzt. Diese hat sich bisher jedoch aus Kostengründen und auf Grund der noch bestehenden Schwächen nicht durchgesetzt.

3 Zielstellung der Arbeit

Die GPOH-MET-97 Studie hat es sich zum Ziel gemacht, die Therapie, Diagnose und Nachsorge maligner endokriner Tumoren bei Kindern und Jugendlichen zu optimieren und die Prognosestellung zu verbessern (Studienprotokoll der GPOH-MET-97). In diesem Rahmen sollten durch die hier vorgestellte Analyse chromosomale Imbalancen von gefrorenem oder paraffineingebettetem Tumormaterial papillärer und follikulärer Schilddrüsenkarzinome ermittelt werden. Es ist das Ziel, mit diesen Daten zytogenetische Marker zu identifizieren, die mit bestimmten klinischen Charakteristika korrelieren und bei der Diagnostik, Therapiegestaltung und Prognoseermittlung hilfreich sind.

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit sind:

1. Ermitteln von Chromatinzugewinnen und/oder Chromatinverlusten papillärer und follikulärer Schilddrüsenkarzinome mit der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)
2. Aufspüren von Chromosomenveränderungen, die mit dem Krankheitsstadium, dem Auftreten von Metastasen und dem Krankheitsverlauf korrelieren und damit als zytogenetische Marker dienen können
3. Aufzeigen der zytogenetischen Diversität beziehungsweise der Gemeinsamkeiten der papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinome, um Unterschiede im Pathogeneseweg und Hinweise auf den Grad der Verwandtschaft beider Tumorentitäten erkennen zu können
4. Vergleichen der ermittelten chromosomalen Veränderungen der Schilddrüsenkarzinome von Kindern mit veröffentlichten zytogenetischen Daten von Schilddrüsenkarzinomen Erwachsener, um einen möglichen Unterschied im Pathogenesemechanismus differenzierter Schilddrüsenkarzinome in Abhängigkeit vom Alter aufzeigen zu können.

4 Material

4.1 Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde Tumormaterial von 22 papillären und 6 follikulären Schilddrüsenkarzinomen untersucht. Dieses wurde freundlicherweise von Pathologen aus ganz Deutschland dem Institut für Humangenetik im Rahmen seiner Tätigkeit als Referenzlabor der GPOH-MET 97 Studie zur Verfügung gestellt.

Im Zeitraum zwischen 1997 und 2003 registrierte die GPOH 65 Kinder im Alter zwischen 5 und 18 Jahren mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom. Bei 55 der 65 Patienten wurde ein papilläres, bei 10 Patienten ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom diagnostiziert. 29 Patienten wurden mit einem medullären Schilddrüsenkarzinom gemeldet. Die letztere Tumorentität bleibt jedoch in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt.

Bei dem untersuchten Patientenmaterial handelte es sich in 27 Fällen um Paraffinmaterial. Paraffinblöcke wurden durch das Institut für Pathologie Jena in Paraffinschnitte mit 20 µm Dicke geschnitten, ein Schnitt wurde HE gefärbt und mit einem Deckglas eingedeckt (Abbildungen 3 und 4). Von einem Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom lag schockgefrorenes Operationsmaterial vor. Von diesem wurden Kryostatschnitte angefertigt und ebenfalls HE gefärbt. Die nochmalige Begutachtung der HE-Schnitte erfolgte durch den Pathologen des Instituts für Humangenetik Jena Dr. Ernst.

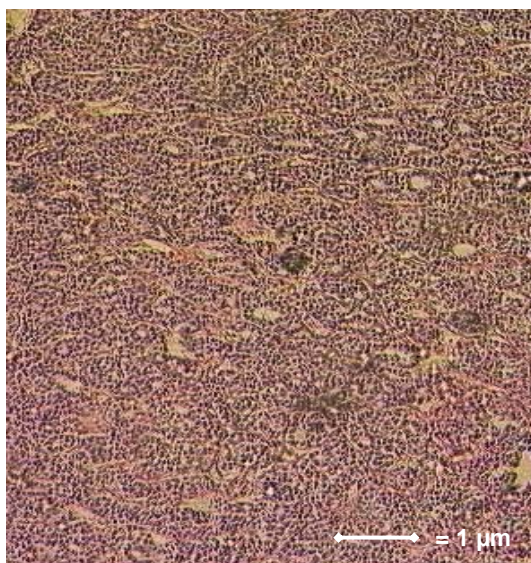


Abbildung 3: Ausschnitt eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms
HE-Färbung, 100fache Vergrößerung

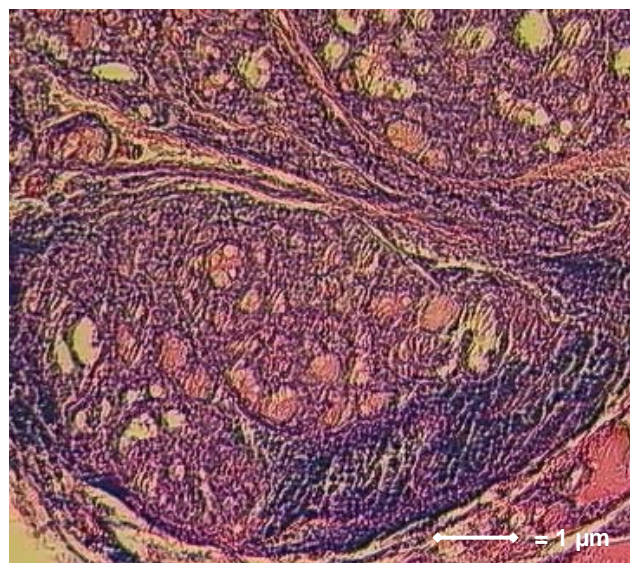


Abbildung 4: Ausschnitt eines papillären Schilddrüsenkarzinoms
HE-Färbung, 100fache Vergrößerung

4.2 Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten und die Chromosomenpräparation

Tabelle 2: Für die Kultivierung von Lymphozyten und die Chromosomenpräparation benötigte Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
Colcemid	Seromed	0,1 µg/ml Endkonzentration
Fixativ	Roth Merck	Eisessig (100%) Methanol - Verhältnis der Gebrauchslösung: Eisessig : Methanol = 1:3
KCl-Lösung	Merck	56 g/ml KCl Gebrauchslösung
Nährmedium	Gibco BRL Biochrom KG Biochrom KG	RPMI 1640 mit Glutamax–Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin Fetales Kälberserum 12% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 mg/ml) 1%
Phytohämagglutinin PHA	Seromed	1,2 mg lyophilisiertes PHA in 5 ml Aqua ad iniectabilia lösen

4.3 Reagenzien für die Entparaffinierung und Färbung von Paraffinschnitten

Tabelle 3: Reagenzien für die Entparaffinierung und HE-Färbung von Paraffinschnitten

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Beschreibung
Eosin Y Solution Aqueous	Sigma	0,5% Gebrauchslösung
Hämalaunlösung nach Mayer	Dr.K.Hollborn & Söhne	sauer
Xylol	J.T.Baker	

4.4 Reagenzien für die DNA-Extraktion

Für die Extraktion der gesamten genomischen DNA aus den Paraffinschnitten wurde das QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Extraktion erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Gewebeprotokoll. Zusätzlich wurde für diese Extraktion benötigt:

Tabelle 4: Zum Quiagen-Kit zusätzlich benötigte Reagenzien für die DNA-Extraktion

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration
Ethanol	J.T.Baker	96-100% Gebrauchslösung
RNase	Roche	10 mg/ml Stammlösung

Die DNA-Extraktion aus Lymphozyten von gesunden Spendern erfolgte nach Standardprotokoll (Grimberg et al., 1989).

Tabelle 5: Reagenzien für die DNA-Extraktion nach Standardprotokoll

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
10xTE-Puffer (pH 8,0)	Roth Sigma	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA
1xSTE-Puffer (pH 8,0)	Roth Sigma	0,5 M Tris-HCl 1 M NaCl 0,01 M EDTA
Ethanol	J.T.Baker	80%, 100%
Lysispuffer pH (7,5)	Roth Sigma	100 mM Tris-HCl 0,32 M Saccharose 1% Triton X-100
NaCl-Lösung	Roth	6 M Stammlösung
Proteinase K	Roche	15,6 mg/ml Endkonzentration
SDS	Roth	20% Natriumdodecylsulfat

4.5 Reagenzien für die Kernextraktion

Tabelle 6: Für die Kernextraktion benötigte Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
Formaldehydpuffer	Roth	3% Formaldehydlösung in 1xPBS Endkonzentration
NaCl	Roth	0,9% Gebrauchslösung
Nytal 55	Sefar AG	55 µm Nylonnetz
PBS Dulbecco (pH 7,0)	Biochrom AG	9,5 g/l Gebrauchslösung (47,55 g PBS ad 5 l Aqua dest.)
Proteinase K-Lösung	Boehringer Mannheim Roth Sigma Roth	5 mg Proteinase K 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 20 µl 0,5 M EDTA (pH 7,0) 2 µl 5 M NaCl ad 1 ml Aqua bidest.

4.6 Reagenzien für die Konzentrationsbestimmung mit der Tüpfelplatte

Tabelle 7: Reagenzien für die Konzentrationsbestimmung mittels Tüpfelplatte

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
1xTBE-Puffer	Roth Pharmacia Biotech Sigma	108 g Tris Puffer 55 g Borsäure 7,44 g EDTA ad 1000 ml Aqua dest.
Agarose	GibcoBRL	
GelStar	Biozym	10000x konzentrierte Stammlösung 2000x konzentrierte Arbeitslösung

4.7 Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.7.1 Reagenzien für die DOP-PCR

Tabelle 8: Material für die DOP-PCR

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
10xStoffel Buffer	Applied Biosystems	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl (pH 8,3)
AmpliTaQ DNA Polymerase Stoffel Fragment	Applied Biosystems	10 U/µl Stammlösung
Aqua ad iniectabila	Braun	
GeneAmp dNTPs	Applied Biosystems	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 mM (Stammlösung)
DOP-Primer	Dr. Birchfeld, IMB Jena	5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3' 40 µM Stammlösung
MgCl ₂ Solution	Applied Biosystems	25 mM MgCl ₂ Stammlösung
Sequenase Dilution Buffer	USB Corporation	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 5 mM DTT 0,1 mM EDTA
Sequenase Reaction Buffer	USB Corporation	5x konzentriert (Stammlösung): 200 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl
Sequenase™ Version 2.0 DNA Polymerase	USB Corporation	13 U/µl Stammlösung

4.7.2 Reagenzien für die Markierungs-PCR

Tabelle 9: Material für die Markierungs-PCR

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung
AmpliTaQ DNA Polymerase	Applied Biosystems	5 U/µl Stammlösung
GeneAmp 10xPCR Buffer II	Applied Biosystems	100 mM Tris-HCl (pH 8,3, 25°C) 500 mM KCl
Label-Mix	Applied Biosystems	GeneAmp dNTPs: dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM

4.8 Verwendete Antikörper, Nukleotide und Zentromersonden

Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Nukleotide und Sonden

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration/Zusammensetzung
Anti-Digoxigenin-Rhodamin Fab-Fragmente	Roche	5,0 µl/50 µl Marvel/4xSSCT
Avidin-Fluorescein-5- isothiocyanat	Vector Laboratories	0,2 µl/50 µl Marvel/4xSSCT
Biotin-16-dUTP	Enzo Biochem	1 mM Stammlösung
Digoxigenin-11-dUTP	Enzo Biochem	1 mM Stammlösung
CEP 17 Alpha SpectrumGreen	Vysis	1 mM Stammlösung
CEP 10 Alpha SpectrumOrange	Vysis	1 mM Stammlösung

4.9 Reagenzien für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Tabelle 11: Reagenzien für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration / Zusammensetzung/ Beschreibung
20xSSC (pH 7,0)	GibcoBRL	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
Ethanol	J.T.Baker	96-100% Stammlösung
Fixogum, Rubber Cement	Marabu	Elastischer Kleber zum Abdichten der Hybridisierungsfelder
Formamid (pH 7,0)	Merck	
HCl	Merck	37% Stammlösung (1 M) 10 mM Gebrauchslösung
Cot Human DNA	Roche	1 µg/µl Stammlösung
Marvel		zu 99% fettfreies Milchpulver
MgCl ₂	Merck	1 M Stammlösung
Paraformaldehyd	Sigma	0,02 g/ml 1xPBS Stammlösung
Pepsin	Sigma	2500 U/mg Substanz 0,02 g/ml Aqua dest. Stammlösung
Phosphatpuffer	Merck	0,5 M Na ₂ HPO ₄ + 0,5 M NaH ₂ PO ₄

4.10 Medien, Lösungen, Puffer und Sonstiges

Tabelle 12: Benutzte Medien, Lösungen, Puffer und Sonstiges

Bezeichnung	Zusammensetzung (Hersteller)	Beschreibung
0,4xSSC (pH 7,0)	10 ml 20xSSC 490 ml Aqua dest.	Posthybridisierungswaschen der Zentromersonden bei 70°C
2xSSC (pH 7,0)	50 ml 20x SSC 450 ml Aqua dest.	Posthybridisierungswaschen
3 M Natriumacetat-Stammlösung (pH 5,2)	24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Merck) in 100 ml Aqua dest.	Fällhilfe bei DNA-Fällung
4'-6'-Diamidino-2-Phenylindol = DAPI Vectashield Mounting Medium	2 µl DAPI-Stammlösung (50 mg/ml) 1 ml Vectashield (Vector Laboratories)	Gegenfärbung der Chromosomen
4xSSC/Tween = 4xSSCT (pH 7,0)	100 ml 20xSSC 400 ml Aqua dest. 250 µl Tween 20 (Sigma)	Posthybridisierungswaschen
50% Formamid/2xSSC (pH 7,0)	50 ml 20xSSC 200 ml Aqua dest. 250 ml Formamid	Posthybridisierungswaschen bei 42°C
70% Formamid/2xSSC (pH 7,0)	10 ml 20xSSC 20 ml Aqua dest. 70 ml Formamid	Denaturierung der Objektträger
Hybridisierungslösung (pH 7,0)	2 g Dextransulfat (Sigma) 2 ml 20xSSC 2 ml 0,5 M Natriumphosphat-puffer 5 ml deionisiertes Formamid ad 10 ml Aqua dest.	Denaturierung und Hybridisierung der Sonden-DNA und der genomischen DNA
Marvel/4xSSCT	0,1 g Marvel in 2 ml 4xSSCT lösen 5 min bei 1500 U/min zentrifugieren, obere Schicht verwerfen	Lösung zum Blocken von freien Bindungsstellen nach Hybridisierung, Verhinderung unspezifischer AK-Bindung

4 Material

Pepsinlösung (100 µg/ml, pH 2,0)	5 ml 0,2 N HCl 95 ml Aqua dest. 500 µl Pepsin	Vorbehandlung der Objektträger vor der Hybridisierung, Verdau störender Proteine
Postfixierungslösung	0,5 ml 1 M MgCl ₂ 4,5 ml 1xPBS 5 ml Paraformaldehyd	Fixierung der Metaphase-chromosomen nach dem Pepsinverdau

4.11 Geräte

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerbezeichnung
CCD-Videokamera	IMAC	
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena	Axioplan 2
Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen	Greiner	
Objektträger	Menzel	Superfrost
Photometer	Kontron Instruments	Uvikon 930
Schüttler	Heidolph	Rotamax 120
Software	Metasystems	Isis
Speed Vac	Savant	DNA 110
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	Hera Safe
Thermocycler	MJ Research	Peltier Thermal Cycler PTC 200
Tiefkühltruhe	Liebherr	
Wärmeschrank	Heraeus Instruments	
Wasserbad	Memmert	
Zentrifugen	Sigma Heraeus Eppendorf National Labnet	Laborzentrifuge 3K10 Labofuge 200 Centrifuge 5804 R Mini Centrifuge C-1200

5 Methoden

5.1 Herstellung zytogenetischer Präparate

5.1.1 Kultivierung von Lymphozyten

Die Kultivierung der Lymphozyten aus dem Blut gesunder Spender erfolgte nach Standardprotokoll (Verma und Babu, 1994). Die kultivierten Lymphozyten wurden zur Gewinnung von Chromosomenpräparaten für die CGH benötigt.

Für die Kultivierung wurde 1 ml heparinisiertes Vollblut zusammen mit 10 ml Nährmedium, 0,1 ml Phytohämagglutinin PHA-L in einer 50 ml Gewebekulturflasche angesetzt und 72 h bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% inkubiert. Phytohämagglutinin ist ein Extrakt der roten Kidney Bohne (*Phaseolus vulgaris*), das die T-Zell-Fraktion der Lymphozyten stimuliert, dagegen die B-Zellen und andere kernhaltige Zellen kaum beeinflusst (Verma und Babu, 1994).

Um die Anzahl der Metaphasezellen zu erhöhen wurden der Blutkultur bei 37°C circa 2 Stunden vor der Chromosomenpräparation 0,1 µg/ml Colcemid zugefügt. Colcemid ist ein synthetisches Analogon zu Colchizin, einem Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Es verhindert die Polymerisierung mikrotubulärer Untereinheiten des Spindelapparats und bewirkt dadurch eine Unterbrechung der Zellteilung. Die Anhäufung von Metaphasen ist die Folge.

5.1.2. Chromosomenpräparation aus kultivierten Lymphozyten

Für die Chromosomenpräparation wurden die kultivierten Zellen durch vorsichtiges Schütteln vom Boden der Kulturflasche gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dem Pellet wurden 10 ml einer hypotonen KCl-Lösung (0,075 M) zugegeben und diese für 20 min bei 37°C inkubiert. Die hypotone Behandlung erhöht das Zellvolumen der Lymphozyten, führt zu einer Lyse der Erythrozytenzellmembran und erlaubt dadurch deren Beseitigung (Hsu, 1952; Henegariu et al., 2001). Bartnitzke et al. (1981) zeigten, dass die Einwirkung einer hypotonen Lösung zu einem Strecken der Chromosomen beiträgt. Vor dem anschließenden Zentrifugieren (5 min, 1500 U/min, Rotorradius=17,5 cm) wurde dem Ansatz 1 ml Fixativ (Methanol:Eisessig=3:1, 4°C) zugegeben, um die Zellen anzufixieren. Die Fixativlösung erhält die Zellen in

ihrem geschwollenen Zustand, entfernt Lipide und denaturiert Proteine (Henegariu et al., 2001). Um die Suspension von Erythrozyten und Plasmaresten zu säubern, erfolgte 3x ein Waschschritt mit folgendem Ablauf:

- Überstand abnehmen und verwerfen
- Fixativ zugeben, das Pellet kräftig resuspendieren
- Zentrifugation 5 min bei 1500 U/min

Nach dem Waschen wurde das Pellet in circa 1 ml Fixativ resuspendiert. Vor dem Auftropfen auf den Objektträger (OT) wurde die Suspension für mindestens 45 min auf Eis gestellt. Sie kann jahrelang bei -20°C aufbewahrt werden.

Der OT wurde vor dem Auftropfen entweder mit Seidenpapier gereinigt oder über Nacht in Spülwasser gestellt und bis zur Verwendung in einer Lagerlösung (35% Methanol, 1% konzentrierte HCl, 64% Aqua dest.) aufbewahrt. Klimatische Bedingungen, wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur (optimal: 50% Luftfeuchte, 20°C) sind wichtige Voraussetzungen, um qualitativ wertvolle Metaphaseplatten mit guter Spreitung zu erhalten (Spurbeck et al., 1996; Hliscs et al., 1997). Um diese Parameter möglichst konstant zu halten, wurde der OT vor der Verwendung in 4°C kaltem Aqua dest. aufbewahrt und zum Auftropfen in eine bei 37°C vorgewärmte feuchte Kammer gelegt. Das Auftropfen von circa 40 µl Suspension erfolgte mit einer Pipette aus 30 cm Höhendistanz. Um eine möglicherweise entstandene Proteinschicht abzuspielen und die Verdunstungszeit zu verlängern, wurden 20 µl Fixativ nachgetropft. Die Suspension wurde über einer 50°C warmen Heizplatte angetrocknet. Diese Verfahrensweisen dienen dazu, die Metaphasen auf dem OT zu fixieren und die Spreitung der Chromosomen zu verbessern (Hliscs et al., 1997). Nach Lufttrocknung des OT erfolgte die Dehydration durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%). Anschließend wurde die Qualität der Chromosomenspreitung im Phasenkontrastmikroskop begutachtet. Die für die CGH in Frage kommenden Stellen wurden markiert. Für die CGH sind Chromosomenpräparate hoher Qualität notwendig. Die Chromosomen sollten vereinzelt, aber nahe beieinander liegen. Von der Spreitung der Metaphaseplatten ist unter Umständen die Hybridisierungsqualität abhängig.

5.1.3 Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer

Die Paraffinschnitte wurden vor der DNA-Extraktion 2-mal 10 min in einer Küvette mit Xylol entparaffiniert. Anschließend erfolgte eine Rehydratation der Schnitte je 10 min in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 70%, 50%, Aqua dest.). Danach wurden die Gewebsschnitte mit einer Hämalaun-Eosin-Färbung gefärbt, das Tumorareal vom Pathologen des Instituts begutachtet und für die sich anschließende DNA-Extraktion gekennzeichnet. Für die HE-Färbung wurden die OT 10 min in eine Küvette mit saurem Hämalaun nach Mayer gestellt, unter fließendem Leitungswasser 14 min gespült, für 20 Sekunden in eine Eosinküvette getaucht und abschließend mit Aqua dest. von überschüssiger Farbe befreit. Die Kerne werden mit dieser Methode blau, alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rottönen gefärbt. Für die sich anschließende DNA-Isolierung aus dem Gewebe wurde ausschließlich das auf diese Art identifizierte Tumorareal verwendet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass in der CGH zu mindestens 70% DNA aus Tumorzellen untersucht wurde.

5.1.4 DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe

Für die CGH werden sowohl normale Referenz-DNA als auch Tumor-DNA benötigt. Dafür ist es erforderlich, genomische DNA aus dem Blut gesunder Spender und aus dem Tumorgewebe der Patienten zu extrahieren. Für die DNA-Extraktion aus tumorösem Schilddrüsengewebe wurde das Gewebeprotokoll des QIAamp DNA Mini Kits von Quiagen gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Das Kit erlaubt eine zeitsparende DNA-Isolierung aus solidem Gewebe. Das Tumorareal wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells vom Objektträger gekratzt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit einem SDS-haltigen Lysepuffer, der die Lyse der Zellen bewirkt, überführt. Der Proteinverdau wurde mit 20 µl einer Proteinase K bei 56°C über Nacht durchgeführt. Eine nochmalige Zugabe von 20 µl der Proteinase K nach einer Stunde Inkubationszeit erfolgte, wenn der Verdau des Gewebes noch nicht sichtbar begonnen hatte. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit der Proteinase K von den vom Hersteller empfohlenen 2 Stunden auf mindestens 14 Stunden sollte die Ausbeute hochmolekularer DNA verbessert werden (Isola et al., 1994). Durch anschließende Zentrifugation wurde die freigesetzte DNA an die Membran der Spinsäulen adsorbiert. Zwei verschiedene Waschpuffer entfernten verbliebene

Kontaminationen. Die gereinigte DNA wurde in konzentrierter Form mit 100 µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) eluiert und bei -20°C gelagert. Da für die CGH RNA freie genomische DNA benötigt wird, wurden vor der Adsorption der DNA an die Spinmembran 40 µl einer RNase zu der Probe pipettiert und 10 min inkubiert.

5.1.5 DNA-Extraktion aus Blut

Die DNA-Isolierung aus dem EDTA-Blut gesunder Spender erfolgte entsprechend der Präparationsmethode nach Anreicherung von Zellkernen, die kostengünstig die Extraktion großer Mengen genomischer DNA erlaubt (Grimberg et al., 1989).

In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 5 ml EDTA-Blut und 45 ml Lysispuffer gegeben. Das Röhrchen wurde geschüttelt, 15 min auf Eis gelegt und währenddessen 2-3x geschwenkt. Daran schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000 U/min (Rotorradius=14 cm, 4°C) zur Pelletierung der Zellkerne an. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 6,5 ml 1xSTE-Puffer resuspendiert. Um die Oberflächenspannung der Proteine herabzusetzen und damit deren Abbau zu beschleunigen, wurden 175 µl 20% SDS hinzugefügt. Es folgte die Zugabe von 60 µl Proteinase K (15,6 mg/ml) und über Nacht die Inkubation bei 50°C auf einem Schüttler. Nachdem der Ansatz 10 min bei 4°C gelagert worden war, um die Proteinase-Aktivität zu stoppen, wurde mit 1/3 Volumenteil gesättigter NaCl-Lösung gefällt (Zentrifugation: 12 min, 4800 U/min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und nun mit 2,5 Volumenteilen absolutem Ethanol gefällt. Die dabei entstehende DNA-Flocke wurde mit einem Glashäckchen gefischt und in 1 ml 80% Ethanol 2x20 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Flocke kurz in absoluten Ethanol getaucht und 1 h bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Über Nacht erfolgte das Lösen der getrockneten DNA in 180-270 µl Aqua bidest. bei 4°C. Die DNA-Lösung wurde auf 1xTE eingestellt und für 1 h auf dem Rollermix bewegt.

5.1.6 Kernextraktion aus Paraffinschnitten

Um die mittels CGH erhaltenen Zugewinne oder Verluste von Chromosomen oder Chromosomenteilen zu verifizieren, wurde bei einem kleinen Teil der Proben eine

Interphase-FISH mit zentromerspezifischen Sonden durchgeführt. Diese erfolgte an Kernen, extrahiert aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe (Liehr et al., 1999). Für die Kernextraktion wurden 3 Gewebsschnitte á 20 µm in 100 ml Xylol für 2x5 min entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%) und in einer 0,9% NaCl-Lösung rehydriert und anschließend das Normalgewebe mit einem Skalpell entfernt. Danach wurde das Gewebe mit 1 ml Proteinase K-Lösung bedeckt und ohne Deckglas für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Proteinase K-Lösung konnte dann zusammen mit dem verdauten Gewebe und den freigesetzten Kernen mit einer Pipette aufgenommen, über ein 55 µm Nylonnetz gegeben und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt werden. In dem Netz verbliebene Kerne wurden durch 2-maliges Waschen mit 4 ml 1xPBS ausgespült und aufgefangen. Die isolierten Kerne wurden durch Zentrifugation (850xg, 8 min) pelletiert, der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 4 ml 1xPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 300 µl abgesaugt und das Pellet darin resuspendiert. Die Suspension wurde auf saubere OT aufgetropft, auf der 40°C warmen Heizplatte und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Die Fixation der OT erfolgte 10 min mit 100 ml Formalinpuffer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die OT 5 min in 1xPBS und 1 min in Aqua dest. gespült. Nach der Dehydration in der aufsteigenden Alkoholreihe konnten die Kerne im Phasenkontrastmikroskop begutachtet werden.

5.2 Bestimmung der DNA-Menge mittels Photometer und Tüpfelplatte

Da die aus dem Tumorgewebe extrahierte DNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl der Probe und dem Grad der tumorbedingten Degeneration der Zellen ist, wurde die optische Dichte der DNA-Lösung bestimmt. So konnte gewährleistet werden, dass in der anschließenden PCR ähnliche DNA-Mengen zur Vervielfältigung eingesetzt wurden. Die DNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch quantifiziert. Dazu wurde eine Verdünnung von 1:10 hergestellt (315 µl Aqua dest., 35 µl Probe). Die Konzentration in µg/ml ergibt sich aus der Multiplikation des gemessenen Extinktionswerts, des Verdünnungsfaktors 10 und des Faktors 50 (Extinktion von 1 entspricht bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml). Zusätzlich wurde die optische Dichte der Lösung bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge wird die Extinktion der Proteinfraction gemessen. Durch

Bildung des Quotienten beider Extinktionswerte können Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung getroffen werden. Der Quotient sollte zwischen 1,5 und 2,1 liegen. Der optimale Messbereich des Photometers liegt bei Werten zwischen 0,1 und 1. Die aus dem paraffineingebetteten Tumorgewebe extrahierte DNA-Menge war häufig sehr gering und unterschritt den optimalen Messbereich. Um dennoch eine Abschätzung der DNA-Menge vornehmen zu können, wurde die Konzentration durch den optischen Vergleich mit der so genannten Tüpfelplatte bestimmt. Dazu wurde ein 2% Agarosegel hergestellt. Es wurden 1,4 g Agarose und 70 ml 1xTBE gemischt, in der Mikrowelle aufgekocht, abgekühlt und 12 µl GelStar hinzugefügt. Das Gemisch polymerisierte in einer Petrischale 30 min im Dunkeln aus. Auf das Gel wurden die Referenz, eine Verdünnungsreihe von Cot 1-DNA, und die Proben (jeweils 2-5 µl) aufgetragen und anschließend unter einer UV-Lampe die DNA-Menge der Proben abgeschätzt.

Die aus circa 3-4 Gewebsschnitten isolierte DNA-Menge variierte je nach Größe des Tumoreals (0,3-1,5 cm Durchmesser) und in Abhängigkeit von anderen Faktoren, wie möglicherweise dem Degradierungsgrad der Zellen, zwischen 1,2 µg und 9 µg.

5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine der wichtigsten Methoden in der modernen Molekularbiologie ist die Polymerasekettenreaktion. Diese von Mullis et al. 1986 zum ersten Mal beschriebene Methode erlaubt eine exponentielle Amplifikation der DNA im Reagenzglas. Saiki et al. (1988) konnten die PCR durch die Einführung der thermostabilen DNA-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, verbessern. Diese ermöglicht eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und eine verbesserte Spezifität, Sensitivität und Ausbeute der amplifizierten Produkte (Saiki et al., 1988).

Die PCR ist eine Kettenreaktion, durch die in circa 30 Zyklen etwa 10^6 - 10^{12} Kopien der Ausgangs-DNA synthetisiert werden können. Die aufeinander folgenden Zyklen bestehen aus den drei folgenden Schritten (Abbildung 5):

1. Denaturierung - Aufspaltung der DNA-Matrize in Einzelstränge bei hohen Temperaturen (95°C)
2. Annealing - Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA
3. Elongation - DNA-Synthese an den Primern durch die Taq-DNA-Polymerase

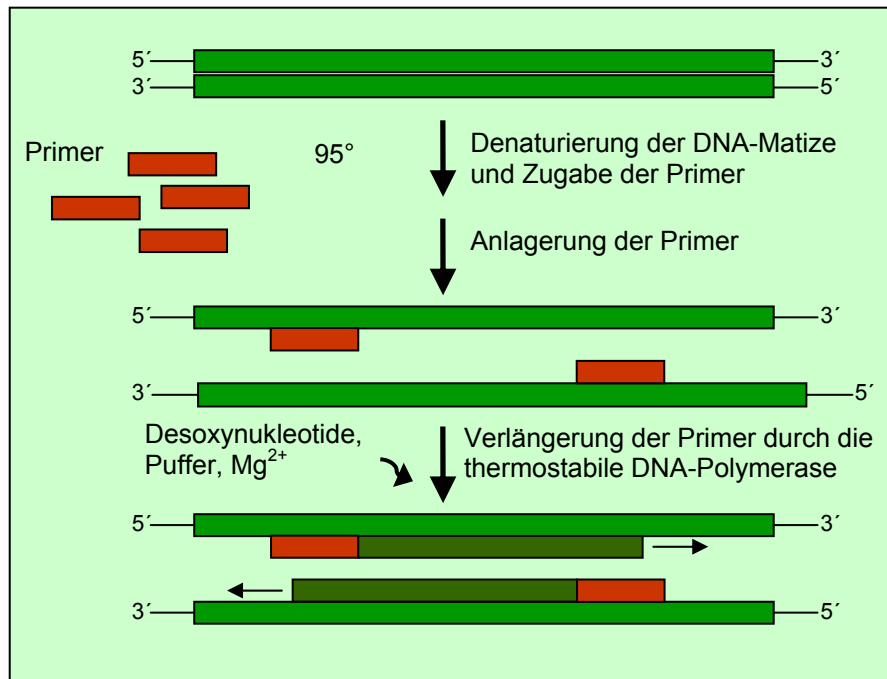


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der PCR (Dingermann, 1999; modifiziert)

5.3.1 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-PCR)

Bei der Standard-PCR-Reaktion werden zur Amplifizierung der Ziel-DNA vorab Sequenzinformationen benötigt, um den Primer entsprechend auszuwählen. Bei einer begrenzt vorliegenden Menge und unbekannten Sequenz der Matrizen-DNA ist es nötig, die DNA mehr oder weniger wahllos zu amplifizieren. Die DOP-PCR, eine Version der Polymerasekettenreaktion mit einem degenerierten Oligonukleotid-Primer, bietet diese Möglichkeit (Telenius et al, 1992). Um die geringe Menge DNA, die aus dem Paraffinmaterial extrahiert wurde, zu amplifizieren, wurde die CGH mit einer DOP-PCR kombiniert (Speicher et al, 1993). Um eine ungleichmäßige Hybridisierung, viele Hintergrundsignale und falschpositive Ergebnisse zu vermeiden, wurden für die Referenz und die Test-DNA identische Amplifizierungs- und Markierungsbedingungen gewählt (Huang et al., 2000). Als negative Kontrolle wurde in jedem DOP-PCR Experiment eine Probe ohne DNA mitgeführt, anschließend markiert und ebenfalls auf einen OT hybridisiert.

Als Primer für die DOP-PCR verwendet man universelle Primer aus 22 Nukleotiden, die eine variable Region aus 6 zufällig gewählten Nukleotiden enthalten. Diese wird am 5'Ende von einer strikteren Bindungsregion und am 3'Ende von der Hauptbindungsregion flankiert (Jung und Weber, 2002). Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. In einem ersten unspezifischen Schritt erfolgt die uniforme

5 Methoden

Preamplifikation aller enthaltenen Sequenzen durch die thermoinstabile Sequenase bei einer niedrigen Annealingtemperatur (25°C). Diese soll die Bindung des Primers an vielen Stellen des Genoms erleichtern. Im zweiten Schritt werden die replizierten DNA-Sequenzen bei höheren Reaktionstemperaturen durch die thermostabile DNA Polymerase exponentiell vervielfältigt (Kuukasjärvi et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde das folgende Protokoll nach Rubtsov et al. (1996) verwendet. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 55 µl. Die Endkonzentration der Reagenzien in den einzelnen Lösungen steht in Klammern. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Lösung A (5 µl)		Lösung B (8x0,25 µl)	
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 200 µM)	0,4 µl	Sequenase™ (1,6 U/µl)	0,4 µl
Sequenase Reaction Buffer (0,6x)	0,6 µl	Sequenase Dilution Buffer	2,8 µl
DOP-Primer (5 µM)	0,63 µl		
genomische DNA (10-90 ng)	x µl		
H ₂ O	ad 5 µl		

Lösung C (45 µl)		Lösung D (5 µl)	
DOP-Primer (1,1 µM)	1,38 µl	10xStoffel Buffer (1x)	0,7 µl
dNTPs (je 240 µM)	4,4 µl	MgCl ₂ (2,5 mM)	0,7 µl
10xStoffel Buffer (1x)	5,0 µl	AmpliTaq DNA Polymerase,	0,7 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	5,0 µl	Stoffel Fragment (1 U/µl)	
H ₂ O	34,22 µl	H ₂ O	4,9 µl

5 µl der Lösung A wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die Denaturierung der enthaltenen genomischen DNA bei 92°C im Thermocycler gestartet. In diesem ersten Zyklus wird die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen "aufgeschmolzen". Im zweiten Schritt wurden 0,25 µl der Lösung B zu dem Ansatz gegeben. Diese enthält die Sequenase, die die Elongation am Primer katalysiert. Die Zyklen 2-4 (Tabelle 14) wurden insgesamt 8x wiederholt, denn die Sequenase muss nach jedem Denaturierungsschritt erneut zugegeben werden, da sie nicht thermostabil ist.

An die Niedrig-Temperatur-Zyklen schließt sich die spezifische Amplifikation mit 30 Zyklen an. Dazu werden zunächst 45 µl einer Pufferlösung (Lösung C) zum

5 Methoden

Reaktionsansatz pipettiert und anschließend das Enzym (5 µl der Lösung D) hinzugegeben.

Während des Pipettierens sollten die Reaktionsgefäße nicht aus dem Thermocycler genommen werden, um die nötigen Temperaturen zu gewährleisten. Die amplifizierten Sonden können mit EDTA versetzt (5 mM Endkonzentration) bei 20°C gelagert werden.

Tabelle 14: Zyklen der DOP-PCR (Thermocycler-Programm)

Zyklen	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	5 min	Initiale Denaturierung
2	25°C	2:20 min	Zugabe der Sequenase (Lösung B) Bindung des Primers (Annealing)
3	34°C	2 min	DNA-Synthese durch Sequenase (Elongation)
4	90°C	1 min	Denaturierung
5	Gehe zu Zyklus 2; Zyklus 2-4 werden noch 7x wiederholt		
6	30°C	2:20 min	Zugabe der Pufferlösung (Lösung C) Primer-Annealing
7	92°C	1 min	Denaturierung
8	56°C	2:20 min	Zugabe der AmpliTaq Polymerase, Stoffel Fragment (Lösung D) Primer-Annealing
9	70°C	2 min	Elongation durch AmpliTaq Polymerase, Stoffel Fragment
10	0,1°/s bis 74°C		
11	92°C	1 min	Denaturierung
12	56°C	1 min	Primer-Annealing
13	70°C	2 min	Elongation durch AmpliTaq Polymerase, Stoffel Fragment
14	0,1°/s bis 74°C		
15	Gehe zu Zyklus 11; Zyklus 11-14 werden 31x wiederholt		
16	72°C	10 min	Elongation
17	4°C	für immer	

5.3.2 Markierungs-PCR

Ein gebräuchliches Verfahren zur Markierung von DNA ist die von Rigby et al. 1977 erstmals beschriebene Nicktranslation. Diese Methode führt durch die von einer DNase erzeugten Einzelstrangbrüche zu einer Verkürzung der Fragmentlänge der zu markierenden DNA. Um in der CGH eine uniforme und optimale Signalintensität entlang der Chromosomen zu erhalten, sind Fragmentlängen der Proben von 600-2000 bp notwendig (Kallioniemi et al., 1994). DOP-PCR-Produkte aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material sind bekanntermaßen schmaler (50-1000 bp) (James und Varley, 1996). Um die Fragmentlänge und damit die Signalqualität zu erhalten, erfolgte in dieser Arbeit die Markierung der DNA mittels einer weiteren PCR. Es wurde bewusst auf die Anwendung der Nicktranslation als Standardmarkierungsmethode verzichtet.

In der Markierungs-PCR diente als Enzym die AmpliTaq DNA Polymerase. Es wurden Biotin beziehungsweise Digoxigenin gekoppelte dUTP eingebaut, so dass die markierten dUTPs einen Teil der dTTPs ersetzen.

Tabelle 15 zeigt das bei der Markierungs-PCR ablaufende Temperatur-Programm.

Tabelle 15: Zyklen der Markierungs-PCR
(Thermocycler-Programm)

Zyklus	Temperatur	Zeit	Beschreibung	Protokoll für 40µl Ansatz	
1	92°C	3 min	Initiale Denaturierung	AmpliTaqaDNA Polymerase (0,03 U/µl)	0,24 µl
2	91°C	1 min	Denaturierung	DOP-Primer (2 µM)	2,0 µl
3	56°C	1 min	Bindung der Primer (Annealing)	Nukleotide (50 µM) Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11-dUTP	2,0 µl
4	70°C	2 min	Elongation	MgCl ₂ (2,5 mM)	4,0 µl
5	Gehe zu Zyklus 2; Zyklus 2-4 werden 31x wiederholt			DOP-amplifizierte DNA	4,0 µl
				GeneAmp 10xPCR Buffer II	4,0 µl
6	72°C	5 min	Elongation	(1x)	
7	4°C	für immer		Label-Mix (70 µM)	4,0 µl
				H ₂ O	20,0 µl

5.4 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

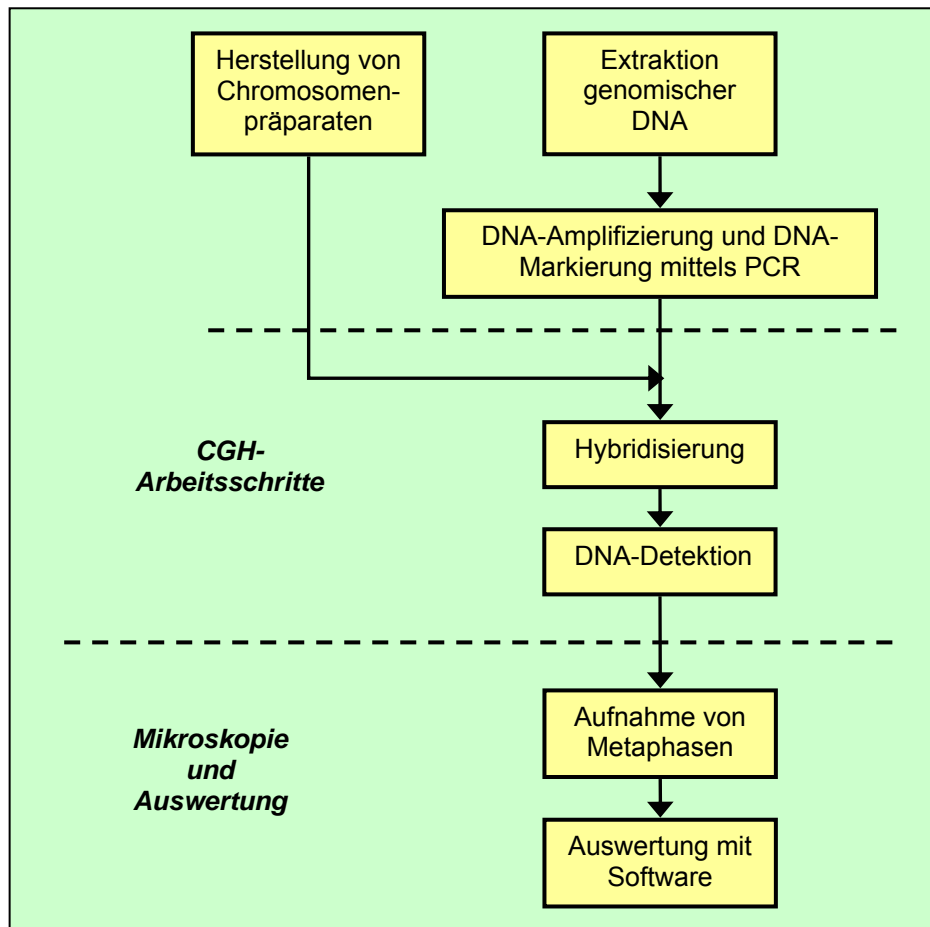


Abbildung 6: Experimenteller Ablauf der CGH

(<http://amba.charite.de/cgh/protocol/02/prot02.html>; modifiziert)

5.4.1 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Nach der Begutachtung der Chromosomenpräparate im Phasenkontrastmikroskop wurde der Objektträger (OT) mit den Metaphaseplatten zunächst 2 Stunden im 60°C Wärmeschränk gealtert, um die Bänderung der Chromosomen besser sichtbar zu machen. Anschließend wurde er für 5 min in eine 37°C warme Pepsinlösung (100 µg/ml) gestellt, um verbliebene Plasmareste zu entfernen und den Hintergrund bei der Hybridisierung zu verringern, der durch unspezifische Bindung der fluoreszenzgekoppelten Antikörper an Proteine entsteht. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen erfolgte ein Waschschrin in 1xPBS für 5 min. Zusätzlich war eine Behandlung des Präparats mit Paraformaldehyd nötig, um die Chromosomen auf dem OT zu fixieren. Dazu wurden 100 µl einer Postfixierungslösung auf den OT

pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und 10 min inkubiert. Abschließend wurde der OT in 1xPBS gestellt (5 min) und in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Da die DNA bei Raumtemperatur doppelsträngig vorliegt, muss sie vor einer Hybridisierung denaturiert werden. Dabei ist auf die Zeitspanne zu achten, da eine zu kurze Denaturierungsdauer eine schlechte Hybridisierungsqualität bedingt, eine zu lange Denaturierung dagegen mit einer Alteration der Chromosomenstruktur einhergeht (Lichter et al, 1994). Der OT wurde kurze Zeit vor der Hybridisierung mit 100 µl einer formamidhaltigen Denaturierungslösung für 3 min auf einer 70°C warmen Heizplatte eingedeckt. Um eine Renaturierung der Einzelstränge zu verhindern, wurde der OT danach sofort in 4°C kalten 70% Alkohol gestellt und abschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

5.4.2 Vorbereitung der DNA-Sonden

Die markierte Tumor- und Referenz-DNA wurde nach abgelaufener PCR vereinigt. Durch die Zugabe von 70 µg Cot 1-DNA, eine unmarkierte DNA-Fraktion, in der hochrepetitive Sequenzen der menschlichen DNA angereichert sind, werden die entsprechenden Sequenzen in den Sonden blockiert (Strachan und Read, 1996). Die DNA-Fällung erfolgte mit 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat und dem 2,5fachen Volumen absoluten Ethanols bei -80°C für 20 min. Danach wurde die gefällte DNA bei 4°C und 15300 U/min 15 min abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde 10 min in der SpeedVac getrocknet und in 15 µl Hybridisierungspuffer bei 50°C gelöst. Die in der Hybridisierungslösung enthaltene Cot 1-, Normal- und Tumor-DNA wurde einem im Thermocycler ablaufendem Temperaturprogramm ausgesetzt. Dabei wurde die doppelsträngige DNA bei 75°C für 5 min denaturiert und nach einem kurzen Zwischenschritt von 4°C für 30 min bei 37°C prähybridisiert. Bereits in diesem Schritt kann die Blockierung der repetitiven Sequenzen der DNA-Sonden durch die Cot 1-DNA erfolgen.

5.4.3 In situ Hybridisierung

Die in situ-Hybridisierung macht sich die Reassoziationskinetik der doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküle zunutze (Leitch et al, 1994).

Für die Hybridisierung wurde die prähybridisierte DNA auf den denaturierten OT gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Um das Austrocknen zu verhindern, wurde das Deckglas mit Fixogum (Rubber Cement) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte mindestens 36 Stunden, um eine ausreichend hohe Signalqualität der CGH zu erhalten.

Um locker gebundene Sonden zu entfernen und nur nahezu perfekt gepaarte Moleküle übrig zu behalten, ist ein Posthybridisierungswaschen des OT obligat. Die Waschschriffe nach der Hybridisierung waren wie folgt:

- 3x5 min 50% Formamid bei 42°C
- 3x5 min 2xSSC bei 42°C
- kurz 4xSSCT bei Raumtemperatur

5.4.4 Detektion der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA erfolgte in dieser Arbeit indirekt. In der Markierungs-PCR wurden dUTPs verwendet, die mit Biotin beziehungsweise Digoxigenin gekoppelt sind. Diese Reportermoleküle mussten im Detektionsschritt mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern detektiert werden. Biotin wurde mit Avidin-FITC und Digoxigenin mit α -dig-Rhodamin detektiert. Um unspezifische Bindungen abzublocken, erfolgte vor der Detektion der Sonden eine 15-minütige Inkubation des OT mit 100 μ l Marvel/4xSSCT bei 37°C. Die Antikörper wurden mit Marvel/4xSSCT angesetzt, nach dem Blocken auf den OT pipettiert (100 μ l), mit einem Deckglas abgedeckt und 40 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen, folgten weitere Waschschriffe: 3x3 min 4xSSCT, 1x5 min 1xPBS auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Der OT wurde dehydriert und im Dunkeln luftgetrocknet.

Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurde der detektierte OT mit 20 μ l Antifade (Vectashield Mounting Medium) eingedeckt. Um die Chromosomen sichtbar zu machen (Gegenfärbung), wurde dem Antifade DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol) zugesetzt. DAPI ruft eine der Giemsa-Färbung ähnliche Bänderung hervor, durch die sich die Chromosomen identifizieren und in ein Karyogramm sortieren lassen. Der fertig gestellte OT konnte sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und ausgewertet werden. Er ist aber auch je nach Fluoreszenzfarbstoff bei -20°C über mehrere Jahre haltbar.

5.4.5 Mikroskopie und Auswertung

Die Mikroskopie und Aufnahme der fluoreszenzgefärbten Chromosomenpräparate erfolgte mit dem Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) und einer CCD-Videokamera (IMAC). Die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch ein Filterset sichtbar gemacht. Für die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse wurde das Software-Programm ISIS der MetaSystems GmbH, Altlussheim verwendet. Um einen Fall auszuwerten, wurden circa 20 Metaphasen aufgenommen, bearbeitet und karyotypisiert. Nur Metaphasen mit guter Qualität und uniformer Hybridisierung wurden in der Auswertung berücksichtigt. Überlappende oder mit Artefakten überlagerte Chromosomen wurden ausgeschlossen.

Das CGH-Programm der ISIS Software ermöglicht eine statistische Auswertung eines Falls. Dabei wird ein Verhältnis aus den entlang aller Chromosomen gemessenen durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Fluorochrome (Menge an hybridisierter Tumor-DNA zu Menge an hybridisierter Normal-DNA) gebildet. Entlang eines einzelnen Chromosoms wird unter Einbeziehung des Verhältniswertes ein Fluoreszenzintensitätsprofil erstellt. Erreicht oder überschreitet dieses Mittelprofil eine definierte Schwelle, so wird in der entsprechenden chromosomalen Region ein Zugewinn oder Verlust vermutet (Barth et al., 2000).

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten die Schwellenwerte festzulegen. Die eine basiert auf festen cutoff-Werten. Eine Abweichung des Mittelprofils entlang eines Chromosoms von dem Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensitäten aller Chromosomen von $>20\%$ nach oben oder unten wird als Aberration gewertet. Die zweite Möglichkeit einen Grenzwert zu definieren, berücksichtigt die statistischen Schwankungen. Hierbei wird die für die jeweilige chromosomale Region berechnete dreifache Standardabweichung vom Verhältniswert der mittleren Fluoreszenzintensitäten als Schwelle, ab der chromosomale Imbalancen sichtbar werden, verwendet. Dadurch wird die Qualität der Hybridisierung berücksichtigt. Entsprechend ist bei optimaler Fluoreszenzintensität und großer Homogenität der Hybridisierung ein enges Intervall zu erwarten. Große Schwankungen in der Hybridisierungsqualität der Metaphasen zeigen sich in einem verbreiterten Intervall. Nach Abwägung der in der Literatur beschriebenen Vor- und Nachteile beider Methoden (7.1) wurden in dieser Arbeit chromosomale Regionen als sicher

überexprimiert interpretiert, wenn das Verhältnis der Fluorochrome 1,15 überschritt und als sicher unterrepräsentiert, wenn das Verhältnis 0,87 unterschritt. Aberrationen, die mittels der dreifachen Standardabweichung aufgedeckt werden konnten, wurden als Aberrationen geringerer Sicherheit gekennzeichnet. Die festen Schwellenwerte wurden mit Hilfe eines Kontrollexperiments, in dem verschieden markierte männliche und weibliche Normal-DNA hybridisiert wurden, festgelegt.

5.4.6 Methodische Besonderheiten

Um die Spezifität der CGH-Ergebnisse zu erhöhen, wurden pro Fall zwei Experimente durchgeführt. Bei der ersten Hybridisierung wurde eine zum Geschlecht der Test-DNA entgegengesetzte Referenz-DNA verwendet. Auf diese Weise erfolgte eine interne Kontrolle der Hybridisierungsqualität, da das Sichtbarwerden des vorhandenen Ungleichgewichts der Geschlechtschromosomen (1:2 für das X-Chromosom beziehungsweise 1:0 für das Y-Chromosom) den Schluss auf spezifische Ergebnisse zuließ. Eine zweite Hybridisierung diente der Reproduktion der ermittelten CGH-Ergebnisse mit einer dem Geschlecht der Test-DNA entsprechenden Referenz-DNA. Diese ermöglichte gleichzeitig eine Beurteilung möglicher Aberrationen der Gonosomen. Mit dem Ziel, die interindividuellen Unterschiede zwischen Test- und Referenz-DNA auszuschalten, wurde versucht, von großen Gewebsschnitten mit sehr kleinem Tumoreal DNA aus vermeintlich „normalen“ Zellen (zum Beispiel Bindegewebszellen) des Patienten zu gewinnen und als Referenz zur Tumor-DNA einzusetzen. Diese Experimente erwiesen sich jedoch als nicht erfolgreich, da vermutlich die Kontamination der Referenz-DNA des Patienten mit Tumor-DNA zu groß war, so dass mittels CGH keine Aberrationen sichtbar gemacht werden konnten. Mit Hilfe dieser Methode konnte jedoch eine Aussage zu artefaktanfälligen Regionen getroffen werden, da interindividuelle Unterschiede in Bereichen repetitiver Sequenzen keine Rolle spielten. Außerdem wurden eine Hybridisierung mit ausschließlich Normal-DNA und ein CGH-Experiment mit vertauscht eingesetzten Fluorochromen zur Beurteilung artefaktgefährdeter Regionen zu Rate gezogen (7.1).

5.5 Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Interphase-FISH)

Die Interphase-FISH ist eine Möglichkeit, um auf dem Einzelzellniveau spezifische numerische Aberrationen, Amplifikationen von Onkogenen und Deletionen von Tumorsuppressorgenen in Paraffingewebsschnitten zu erforschen (Liehr et al., 1999). In dieser Arbeit wurde die Interphase-FISH zur Verifizierung eines Teils der mittels CGH erhaltenen Ergebnisse verwendet.

Dazu wurden Kerne aus dem paraffineingebetteten Tumorgewebe isoliert und auf einen OT getropft (5.1.6). Die Vorbehandlung des OT erfolgte entsprechend der Vorbehandlung der Chromosomenpräparate für die CGH, jedoch mit einigen Abwandlungen, die hier genannt sein sollen. Der OT wurde für 5 min in 2xSSC bei Raumtemperatur gestellt, mit 100 µl einer RNase Lösung (50 µg/ml 2xSSC) für 15 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und anschließend wieder für 3 min in 2xSSC gestellt. Die Pepsinbehandlung des OT erfolgte für 8 min bei 37°C, wobei eine geringere Konzentration der Lösung (50 µg/ml) gewählt wurde, um ein mögliches Kernablösen vom OT zu verhindern. Die anschließende Fixierung der Kerne auf dem OT erfolgte für 5 min in einer Küvette mit einer 5% 1xPBS/MgCl₂ – Lösung, die dann durch einen Formalinpuffer ersetzt wurde (10 min Inkubation). Es folgte die Dehydrierung des OT in der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Zeit der Denaturierung wurde aufgrund der vorangegangenen Formalinfixierung auf 12 min erhöht, um eine gute Hybridisierungsqualität zu gewährleisten. Zum Einsatz kamen dabei kommerziell erhältliche direktmarkierte zentromerspezifische Sonden von Vysis. Diese wurden nach den Angaben des Herstellers mit einem Hybridisierungspuffer angesetzt, für 5 min bei 75°C denaturiert und auf den vorbereiteten OT aufgetragen. Eine Hybridisierung über Nacht war ausreichend, um eine hohe Signalintensität zu erhalten. Die Posthybridisierungswaschung erfolgte schonend in 0,4xSSC bei 68°C für 2 min. Zur internen Kontrolle wurde eine für das Zentromer des Chromosoms 10 spezifische Referenzsonde mitgeführt, die in der CGH keine Aberration aufwies.

5.6 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit sollte mit statistischen Mitteln geprüft werden, ob einzelne mit der CGH ermittelte Aberrationen bei Patienten mit PTC signifikant für verschiedene klinische und morphologische Merkmale (Krankheitsstadium 6.8, Tabelle 18; radiotherapeutische Vorbehandlung, Krankheitszustand, Auftreten von Metastasen 6.9) sind. Mit der SPSS-Software wurde Fishers exakter Test durchgeführt. Mit diesem Test konnte festgestellt werden, ob in der untersuchten Patientenpopulation ($n=20$) Unabhängigkeit und damit indirekt ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Aberration und dem betrachteten Merkmal (z.B. Zugewinn 1q und Krankheitsstadium) besteht. Die Testbedingungen (Stichprobe des Umfangs n , zwei Alternativmerkmale mit je zwei möglichen Ausprägungen, eine der erwarteten Häufigkeiten der Merkmale kleiner als 5) waren gegeben (Weiß, 2002).

Daneben wurde getestet, ob sich die Mediane der Merkmale „mittlere Anzahl der Aberrationen“, „Anzahl der Zugewinne“ und „Anzahl der Verluste“ in je zwei voneinander unabhängigen Patientengruppen (aggressives/nichtaggressives Krankheitsstadium; radiotherapeutische Vorbehandlung ja/nein; CCR/PR, Stillstand, Metastasen; (Fern-) Metastasen vorhanden/nicht vorhanden) unterscheiden (6.8; 6.9). Bei den gewählten Merkmalen handelt es sich um nichtparametrische Merkmale mit vielen möglichen Ausprägungen. Über die Verteilung der Merkmale wurde keine Annahme gemacht. Als Test wurde der Mann-Whitney-U-Test mit Hilfe der SPSS-Software durchgeführt (Weiß, 2002).

Für beide Tests wurde das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt. Die für die jeweilige Untersuchung aufgestellte Nullhypothese wurde nur bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ abgelehnt. Dies bedeutet die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese irrtümlich abzulehnen und so einen Fehler 1. Art zu begehen, betrug weniger als 5%. Aussagen mit $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant, Aussagen mit $p < 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet.

Um die Stärke und Richtung des linearen Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Aberrationen und dem Diagnosealter beziehungsweise der Tumorgröße zu prüfen, wurde der Maßkorrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt (Weiß, 2002; 6.6).

6 Ergebnisse

6.1 Auswertungsstrategie der CGH-Analyse

In der vorliegenden Arbeit konnte Paraffinmaterial von 6 follikulären und 20 papillären Schilddrüsenkarzinomen auf Art und Häufigkeit der chromosomalen Imbalancen mit der CGH untersucht werden.

Ein erstes Hybridisierungsexperiment ermöglichte durch den Einsatz einer zum Geschlecht der Test-DNA entgegengesetzten Referenz-DNA eine interne Kontrolle der Hybridisierung. Deren Ergebnisse wurden als spezifisch gewertet, wenn die Imbalance der Gonosomen (1:2 für das X-Chromosom beziehungsweise 1:0 für das Y-Chromosom) sichtbar wurde. Eine zweite Hybridisierung mit einer dem Geschlecht der Test-DNA entsprechenden Referenz-DNA erfolgte mit dem Ziel, die ermittelten CGH-Ergebnisse zu reproduzieren und mögliche Aberrationen der Gonosomen zu beurteilen. Insgesamt wurden pro Fall und Experiment circa 20 Metaphasen karyotypisiert und mit der entsprechenden Software statistisch ausgewertet. In der Auswertung und Zusammenfassung aller Aberrationen der 6 beziehungsweise 20 Fälle wurden nur solche berücksichtigt, die in beiden Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen werden konnten. Werte, die aus dem festgesetzten Schwellenbereich von 0,87-1,15 heraustraten, wurden als sichere Aberrationen interpretiert und mit durchgezogenen Linien graphisch dargestellt. Imbalancen, die erst unter Berücksichtigung der dreifachen Standardabweichung sichtbar waren, wurden dagegen als Daten geringerer Sicherheit gewertet und mit gestrichelten Linien vermerkt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgte getrennt nach Tumorentitäten (Abbildungen 10 und 11).

Perizentromer- und Telomerregionen wurden ebenso wie die blass dargestellten Chromosomen 19, 22, Y und der Bereich 1p32-pter als in der CGH-Analyse bekanntermaßen artefaktanfällig Bereiche (7.1) von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine Metaphase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms (FTC), deren Chromosomen, in Abbildung 8 dargestellt, karyotypisiert wurden. Das zu diesem Fall gehörende CGH-Profil zeigt Abbildung 9.

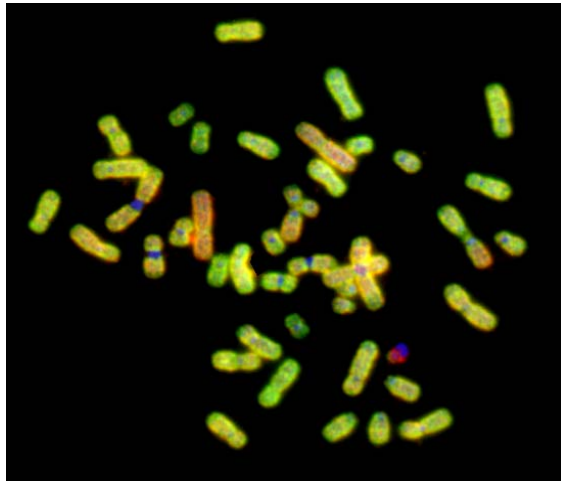


Abbildung 7: Mischfluoreszenz einer Metaphaseplatte nach CGH (Fall 01-028)
 Test-DNA Biotin markiert (grün),
 Referenz-DNA Digoxigenin markiert (rot),
 DAPI-Gegenfärbung blau

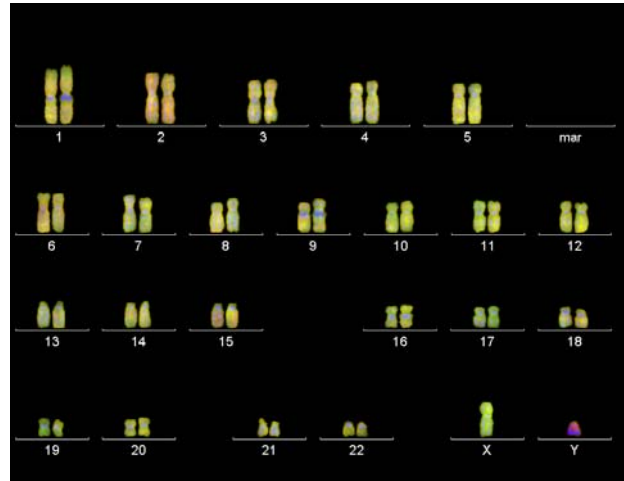


Abbildung 8: Im Karyogramm sortierte Chromosomen aus Abbildung 7
 Für die statistische Auswertung ist eine Karyotypisierung von 20 Metaphasen nötig.

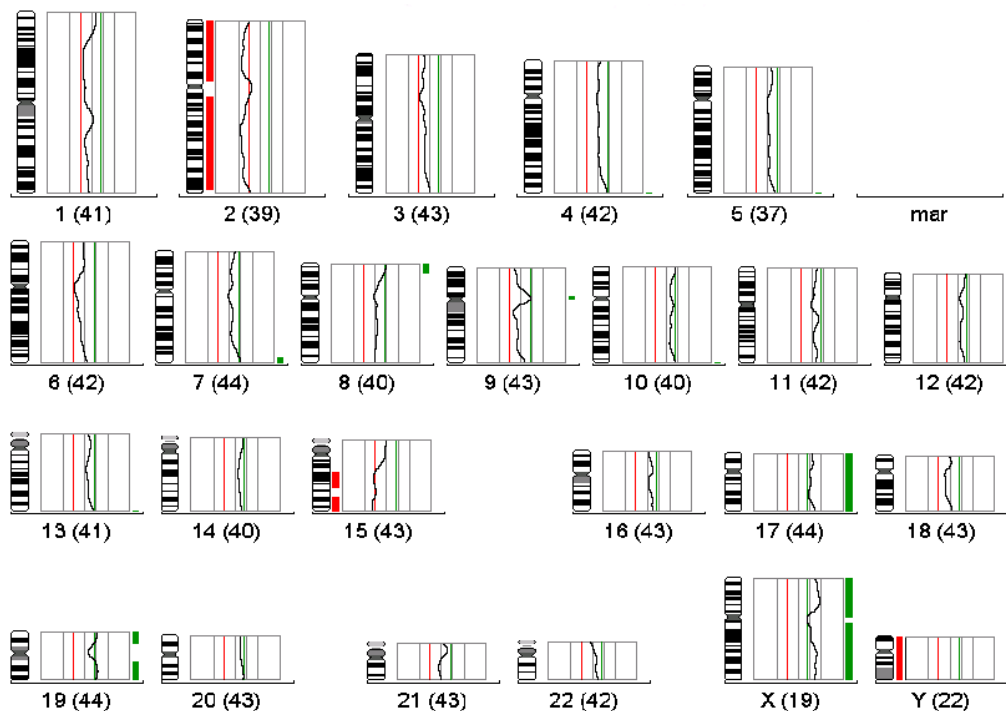


Abbildung 9: CGH-Profil des Falls 01-028

Zugewinne sind durch grüne, Verluste durch rote Balken gekennzeichnet. Die Test-DNA ist weiblich, die Referenz-DNA ist männlich. In Klammern ist die Zahl der ausgewerteten Chromosomen aufgeführt. Auffallende Aberrationen sind Verluste der Chromosomen 2 und 15q, sowie ein Zugewinn von Chromosom 17.

6.2 Chromosomale Imbalancen follikulärer Schilddrüsenkarzinome (FTC)

Sechs follikuläre Schilddrüsenkarzinome wurden mit der CGH untersucht. Chromosomale Veränderungen zeigten alle 6 bearbeiteten Tumoren (100%). Die mittlere Zahl der Aberrationen pro Fall lag bei 5,5 (Median), wobei mindestens 2 und höchstens 12 Chromosomenveränderungen auftraten. Neunundsechzig Prozent der Aberrationen erwiesen sich als Zugewinne von ganzen Chromosomen beziehungsweise von Chromosomenabschnitten, einunddreißig Prozent waren Verluste. Die Veränderungen verteilten sich auf 16 Chromosomen (Abbildung 10). Die häufigste Veränderung war ein Zugewinn des chromosomalen Bereichs 17q, der in allen 6 Fällen vorlag (100%). Weitere häufige Zugewinne betrafen den kurzen Arm des Chromosoms 17 in 5 von 6 (83%) und den langen Arm des Chromosoms 20 in 4 von 6 Fällen (67%). Die übrigen Aberrationen verteilten sich annähernd gleichmäßig auf verschiedene Chromosomen. Insgesamt zeigte sich ein sehr breites Spektrum an Veränderungen.

Eine Zusammenfassung der Imbalancen von allen 6 untersuchten follikulären Schilddrüsenkarzinomen zeigt Abbildung 10. Jede (gestrichelte) Linie repräsentiert eine Aberration. Linien auf der rechten Seite der Chromosomen kennzeichnen Zugewinne, solche auf der linken Seite kennzeichnen Verluste von chromosomalen Bereichen.

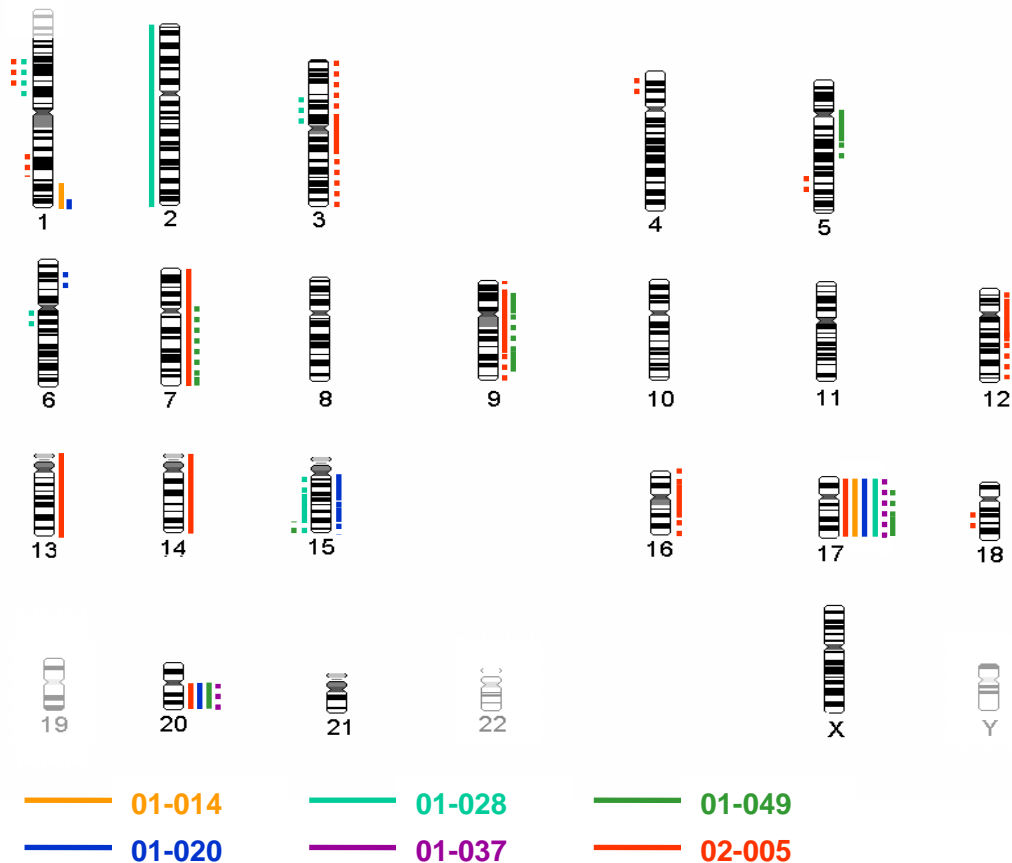


Abbildung 10: Chromosomale Imbalancen von 6 follikulären Schilddrüsenkarzinomen
 Jede (gestrichelte) Linie steht für eine Aberration. Linien auf der rechten Seite der Chromosomen bedeuten Zugewinne, Linien auf der linken Seite Verluste. Durchgezogene gezeichnete Linien kennzeichnen sichere Aberrationen, gestrichelt gezeichnete Linien kennzeichnen Daten geringerer Sicherheit. Blass gezeichnete Chromosomen 19, 22, Y und 1p32-pter wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Jeder Fall wurde mit einer Farbe dargestellt.

6.3 Chromosomale Imbalancen und klinische Merkmale der Patienten mit FTC

Die mittels CGH ermittelten chromosomalen Imbalancen sollen im Zusammenhang zu klinischen Parametern betrachtet werden (Tabelle 16). Auf diese Weise ist es möglich, prognostisch relevante zytogenetische Marker aufzudecken. Da die Zahl der untersuchten follikulären Schilddrüsenkarzinome jedoch sehr klein ist, wird im Folgenden bewusst auf statistische Analysen verzichtet.

Vier der sechs Patienten mit einem follikulären Schilddrüsenkarzinom sind Mädchen, nur zwei Patienten haben männliches Geschlecht. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 12 Jahre (6 ¼ - 17 Jahre). Das

Tumorzvolumen maß im Mittel 8,38 cm³ (Median). Alle FTC wurden im Krankheitsstadium 1 diagnostiziert und zeigten weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen. Bei vier der Patienten wurde ein minimal invasives FTC festgestellt, bei den übrigen zwei Kindern fehlt die Angabe zur Invasivität. Alle Patienten befinden sich derzeit in kompletter Remission. Weitere klinische Daten, wie familiäre Vorbelastung, Hormonstatus, etc., fehlen in dieser Betrachtung, da sie als nicht relevant für die Auswertung bewertet werden konnten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Patienten ähnliche klinische Merkmale (derzeitiger Zustand des Patienten, Krankheitsstadium, Vorhandensein von Metastasen) aufweisen. Diese sind alle mit einer günstigen Prognose in Einklang zu bringen. Dennoch lassen sich bei den einzelnen Patienten Unterschiede in den genetischen Daten bemerken. Die Anzahl der Aberrationen differiert deutlich zwischen 2 und 12. Sie zeigt jedoch keine Korrelation zum Tumorzvolumen, Alter oder Geschlecht des Patienten. Beispielsweise weist der Fall 02-005 mit einem minimal invasiven FTC die geringste Tumorzgröße (2,20 cm³), jedoch die größte Anzahl an Aberrationen (12) auf. Der Fall 01-028 mit dem größten Tumorzvolumen zeichnet sich aber ebenfalls durch eine hohe Zahl (6) an chromosomalen Imbalancen aus. Mit den zur Verfügung stehenden Daten ist kein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn der Chromosomen 17 beziehungsweise 20 q und einem bestimmten klinischen Verlauf zu erkennen.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der klinischen, morphologischen und genetischen Daten der follikulären Schilddrüsenkarzinome

Klinische Daten					Morphologische Daten			Genetische Daten (CGH-Daten)		
PatNr	Geschlecht	Alter	ZuPat/BeobZeit	Sta	pTNM	Metastasen/ Invasivität	TuVol in cm³	Zugewinne	Verluste	Zahl der Aberrationen
01-014	w	162	CCR / 2,1	1	pT2N0M0	Keine / k.D.	k.D.	1q32.1-qter, 17, 20q		3 (3/0)
01-020	m	75	CCR / 0,75	1	pT2N0M0	Keine / k.D.	7,50	1q42.3-qter, 6p21.3-p23, 15q, 17, 20q		5 (5/0)
01-028	w	166	CCR / 0,3	1	pT2N0M0	Keine / minimal invasiv	15,63	17	1p22.1-p35, 2, 3p11.1-p21.2, 6q11-q16.1, 15q	6 (1/5)
01-037	w	206	CCR / 0,6	1	pT2N0M0	Keine / minimal invasiv	9,26	17,20q		2 (2/0)
01-049	m	100	CCR / 3,6	1	pT1N0M0	Keine / minimal invasiv	k.D.	5q11.2-q22, 7q, 9, 12, 17q, 20q	15q25-qter	7 (6/1)
02-005	w	156	CCR / 2,7	1	pT2aN0M0	Keine / minimal invasiv	2,20	3, 7, 9, 12, 13, 14, 16, 17	1p22.3-p35, 1q25-q32, 4p13-p15.3, 5q31.1-q32, 18q12.1-q22	12 (8/4)

CCR=komplette Remission (Complete Continuous Remission); k.D.=keine Daten vorhanden; PatNr=Patienten-Nummer; Alter=Alter zum Zeitpunkt der Diagnose in Monaten; ZuPat=aktueller Zustand des Patienten; BeobZeit=Beobachtungszeitraum; Sta=Krankheitsstadium laut Studienprotokoll; pTNM= postoperative histopathologische Tumorklassifikation (T-Primärtumorausbreitung; N- Aussage über Lymphknotenmetastasen; M-Aussage über Fernmetastasen); in runden Klammern: Zahl der Zugewinne/Verluste

6.4 Chromosomale Imbalancen papillärer Schilddrüsenkarzinome (PTC)

Chromosomale Veränderungen konnten mit der CGH in 20 der bearbeiteten 22 papillären Schilddrüsenkarzinome ermittelt werden. Die übrigen 2 Fälle mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da entweder die Hybridisierungsqualität wiederholt nicht ausreichend war oder eine zu große Verunreinigung der Probe mit Normalzellen angenommen werden musste. Alle 20 bearbeiteten Fälle zeigten mindestens eine chromosomale Veränderung, wobei im Mittel pro Fall 4 Aberrationen auftraten (Median; Range 1-12). Zugewinne (70%) waren häufiger vertreten als Verluste (30%). Die Veränderungen verteilten sich auf 11 Chromosomen. In 90% (18/20) der ausgewerteten Fälle lag ein Zugewinn des chromosomalen Bereichs 17q und in 80% (16/20) ein Zugewinn des Bereichs 17p vor. Weitere Zugewinne betrafen den langen Arm des Chromosoms 15 (13/20; 65%) und des Chromosoms 20 (10/20; 50%). Verluste konnten wesentlich seltener beobachtet werden (70% vs. 30%). Der häufigste Verlust trat im Teilbereich des Chromosoms 6 in 6q11-q16.3 bei nur 5 der 20 papillären Schilddrüsenkarzinome (30%) auf.

Eine Zusammenfassung aller ermittelten chromosomalen Imbalancen der papillären Schilddrüsenkarzinome zeigt Abbildung 11. Jede (gestrichelte) Linie kennzeichnet eine Aberration. Zugewinne sind durch Linien auf der rechten Seite der Chromosomen, Verluste durch Linien auf der linken Seite repräsentiert.

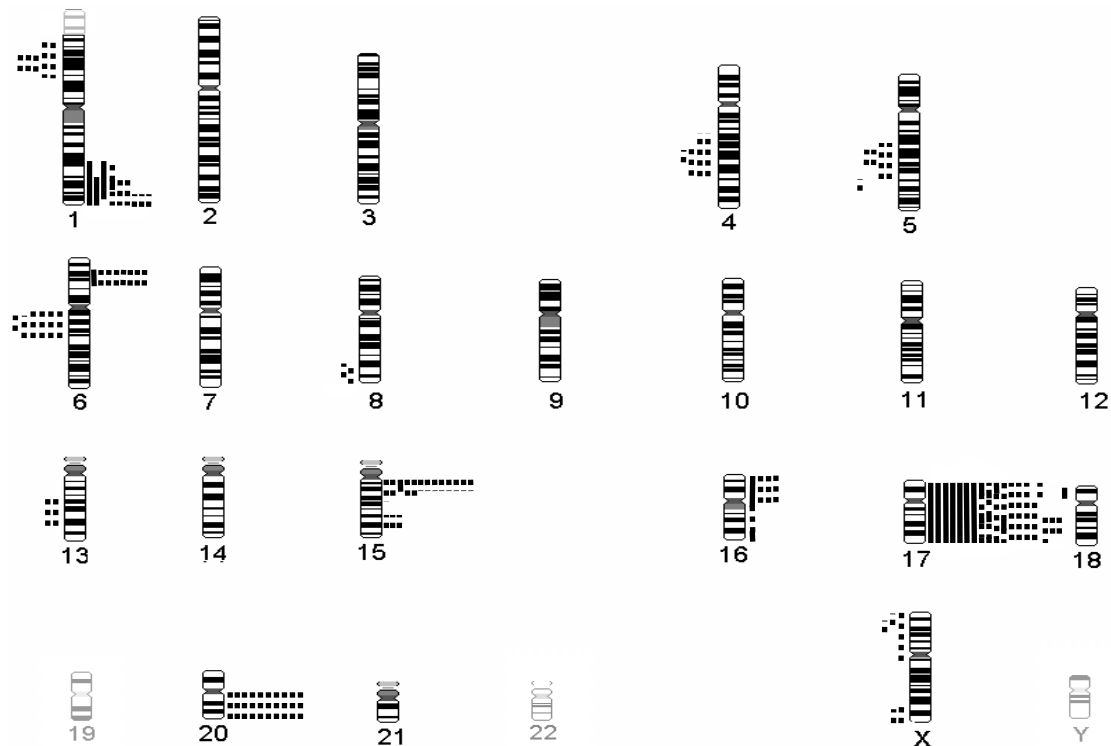


Abbildung 11: Chromosomale Imbalancen von 20 papillären Schilddrüsenkarzinomen

Jede (gestrichelte) Linie repräsentiert eine Aberration. Linien auf der rechten Seite der Chromosomen kennzeichnen Zugewinne, Linien auf der linken Seite Verluste. Durchgezogen gezeichnete Linien stehen für sichere Aberrationen, gestrichelt gezeichnete Linien für Daten geringerer Sicherheit. Blass gezeichnete Chromosomen 19, 22, Y und 1p32-pter wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

6.5 Relevante klinische Merkmale der Patienten mit PTC

Im Folgenden seien die wesentlichsten klinischen Daten der Patienten mit PTC genannt. Tabelle 17 fasst diese zusammen.

In der untersuchten Patientengruppe besteht eine starke Mädchenwendigkeit (3 Jungen, 17 Mädchen). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 12 Jahre, dabei differierte das Alter zwischen 56 (4,7 Jahre) und 233 Monaten (19,4 Jahre). Das Tumolvolumen maß im Mittel 8,00 cm³ (Median; minimal 0,51 cm³, maximal 125,00 cm³). Die PTC zeichnen sich durch eine überwiegend günstige Prognose aus. Zurzeit befinden sich 12 der untersuchten Patienten in kompletter Remission, das heißt es sind keine Tumorreste nachweisbar. Bei 4 Patienten konnte durch die Therapie eine Verkleinerung des Tumors (partielle Remission) erreicht werden. Bei einem Patient stagniert das Tumorwachstum, ein anderer lebt derzeit noch mit Metastasen in der Lunge. Kein Patient erlitt bisher ein Rezidiv oder ist an den Folgen eines PTC verstorben. Die vorliegenden Daten bestätigen die

bekannte hohe Inzidenz von Lymphknoten- und Fernmetastasen kindlicher FTC (Parlowsky et al., 1996). Bei 15 Patienten wurden Lymphknotenmetastasen (65%), bei 5 Patienten zusätzlich Fernmetastasen (25%; 1x Skelett, 4x Lunge) diagnostiziert. Aufgrund der Tumorausdehnung beziehungsweise des invasiven Wachstums des Tumors in die Schilddrüsenkapsel mussten 14 PTC in ein fortgeschrittenes Tumorstadium (Stadium 3 beziehungsweise 4 laut Studienprotokoll) eingestuft werden. Sechs lokal begrenzt wachsende PTC wurden als Stadium 1-Tumoren eingeordnet. Unter den Kindern und Jugendlichen mit PTC gibt es drei Fälle, die vor dem Auftreten des PTC radiotherapeutisch bestrahlt worden sind (in Tabelle 17 rot markiert). Bei zwei Fällen erfolgte die Bestrahlung aufgrund eines bestehenden Tumors (01-060 Morbus Hodgkin; 02-003 Rhabdomyosarkom). Ein dritter Patient erhielt eine Herzkatheteruntersuchung (01-034).

Tabelle 17: Gegenüberstellung der klinischen, morphologischen und genetischen Daten der papillären Schilddrüsenkarzinome

Klinische Daten					Morphologische Daten			Genetische Daten (CGH-Daten)		
PatNr	G	Alt	ZuPa/BeZ	St	pTNM	Metast	TuVo	Zugewinne	Verluste	Total
01-015	W	208	CCR / 4	3	pT2N1aMx	LK	k.D.	1q41-qter, 6p22.1-p23, 15q11.2-q15, 15q23-q26.1, 17, 20q		6 (6/0)
01-021	W	120	PR / 4,25	4	pT4bN1bMx	LK	k.D.	6p22.1-p23, 15q11.2-q15, 15q23-q26.1, 17, 20q	4q25-q31.2, 6q11-q16.3,	7 (5/2)
01-022	W	166	CCR / 3,1	1	pT2N0M0	Nein	14,00	17		1 (1/0)
01-032	W	97	CCR / 3,1	3	pT2N1M0	LK	6,00	15q11.2-q15, 16p, 17q21.2-qter, 20q	1p22.2-p31.2, 5q31.2-q33.2, 6q12-q15	7 (4/3)
01-034	W	87	CCR / 1,9	4	pT4N1bMx	LK,Skelett	8,00	6p22.1-p23, 15q11.2-q14, 17	Xp, Xq25-qter	5 (3/2)
01-035	W	70	CCR / 5,4	4	pT4N1aMx	LK	k.D.	15q11.2-q15, 17q21.2-q24		2 (2/0)
01-040	W	167	PR / 1,2	4	pT4N1bM1	LK,Lunge	33,75	1q41-qter, 6p22.1-23, 16p, 17, 20q	5q14-q23.3, 6q11-q16.3	7 (5/2)
01-050	W	174	k.D.	1	pT2N0Mx	Nein	1,00	1q31.1-qter, 15q11.2-q14, 17q21.2-q24, 20q		4 (4/0)
01-052	W	192	CCR / 2,8	1	pT2N0M0	Nein	k.D.	1q31.3-qter, 15q11.2-q14, 17, 20q		4 (4/0)
01-054	W	154	k.D.	4	pT4N1M0	LK	125,0	1q31.1-q42.2, 17p11.1-p13.1		2 (2/0)
01-060	M	233	CCR/ 3,25	4	pT4N1aM0	LK	k.D.	15q11.2-q14, 17	8q23-qter	3 (2/1)
01-062	W	56	CCR / 0,5	1	pT3N0M0	Nein	17,50	1q31.3-qter, 6p22.1-23, 15q11.2-q14, 17		4 (4/0)
01-065	W	142	PR / 1,4	4	pT4aN1bMx	LK,Lunge	8,10	17, 20q	1p22.2-p31.2, 4q21.3-q31.1, 5q14-q23.3, 6q11-q16.3	6 (2/4)
01-067	W	177	CCR / 1,7	1	pT1aN1aMx	LK	0,51	17, 20q		2 (2/0)
02-003	W	156	CCR / 2,6	4	pT4N1bMx	LK	4,91	17q		1 (1/0)
02-007	W	170	CCR / 4,9	4	pT4N1bM0	LK	16,00	1q31.1-qter, 15q11.2-q14, 17	Xp21.3-p22.2	4 (3/1)
02-014	M	83	Stillst / 0,8	4	pT4N1bM0	LK,Lunge	15,00	6p22.1-p23, 15q11.2-q14, 15q23-q26.1, 16, 17, 20q	1p22.2-p33, 4q24-q27, 5q22-q23.3, 6q12-q16.3, 13q21.1-q31	11 (6/5)
02-017	W	176	PR / 3,25	3	pT2bN1bMx	LK	3,38	6p22.1-p23, 15q11.2-q14, 16p, 17	1p22.1-p31.2, 4q21.2-q31.1, 5q22-q23.3, 6q11-q16.3, 8q23-q24.2, 13q21.1-q31, Xp22.1-pter, Xq26-qter	12 (4/8)
02-020	M	120	Meta / 3	4	pT4N1M1	LK,Lunge	1,26	1q41-qter, 17p	1p22.2-p33	3 (2/1)
02-026	W	137	CCR / 2,6	1	pT2aN0M0	Nein	5,83	1q31.3-qter, 6p22.1-p23, 15q11.2-q14, 17, 20q		5 (5/0)

PatNr=Patienten-Nummer; G=Geschlecht; Alt=Alter in Monaten; ZuPa=aktueller Zustand des Patienten; BeZ=Beobachtungszeitraum in Jahren; St=Stadium laut Studienprotokoll; pTNM=postoperative histopathologische Klassifikation; Metast=Metastasen; TuVo=Tumorzvolumen in cm³; Total=Gesamtzahl der CGH-Aberrationen, in Klammern Zahl der Zugewinne/Verluste; LK=Lymphknoten; CCR=komplette Remission; PR=partielle Remission; Stillst=Stillstand; Meta=Metastase(n) noch vorhanden; rot markierte Fälle sind solche mit radiotherapeutischer Vorbehandlung

6.6 Zusammenhang zwischen Tumorzvolumen, Diagnosealter und Anzahl der Aberrationen der PTC

In dieser Arbeit wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen den ermittelten Aberrationenzahlen und dem Diagnosealter (in Monaten) beziehungsweise der Tumorzgröße (in cm^3) als möglichen Einflussfaktoren auf die Malignität des Tumors herzustellen. Als Maßzahl für die Stärke und Richtung des linearen Zusammenhangs wurde der Maßkorrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Abbildung 12 zeigt die Punktediagramme zur graphischen Veranschaulichung der untersuchten Zusammenhänge. In der bearbeiteten Stichprobe konnte kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Aberrationenzahl und Tumorzvolumen ($r = 0,19$) beziehungsweise Aberrationenzahl und Diagnosealter ($r = 0,135$) nachgewiesen werden. Die Anzahl der Aberrationen tritt unabhängig von diesen Faktoren auf.

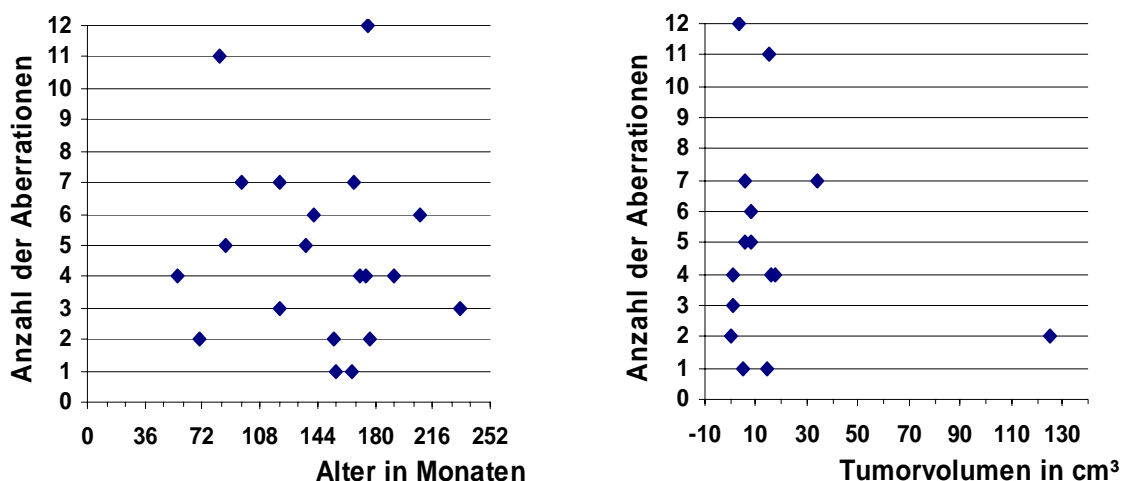


Abbildung 12: Punktediagramme zum Zusammenhang zwischen Anzahl der Aberrationen und Diagnosealter (links) beziehungsweise Tumorzvolumen (rechts)

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Größen ist in der bearbeiteten Stichprobe nicht sichtbar.

6.7 Chromosomale Imbalancen in Tumoren unterschiedlicher Ausdehnung

Um die Beziehung zwischen der Ausdehnung des Primärtumors entsprechend der pTNM-Klassifikation und der Art der CGH-Veränderungen zu untersuchen, wurden alle Aberrationen der 20 PTC gruppiert nach der postoperativ histopathologisch klassifizierten Tumorausbreitung pT1-4 (pTNM entsprechend ICD-0 C73, Wittekind et al., 2002) in einem Ideogramm zusammengefasst (Abbildung 13). Jede (gestrichelte) Linie bedeutet eine mittels CGH aufgedeckte Aberration. Dabei kennzeichnen

schwarze Linien Tumoren im Stadium pT1 (Tumorausdehnung < 1 cm), blaue Linien kennzeichnen die Tumorausdehnung pT2 (1-4 cm), grüne Linien die Tumorausdehnung pT3 (> 4 cm) und rote Linien zeigen Tumoren, die Stadium pT4 aufweisen (Tumor jeder Größe mit Überschreiten der Schilddrüsenkapsel).

Durch diese Darstellung lässt sich erkennen, dass bestimmte Zugewinne bei allen Stadien der Tumorausdehnung vertreten sind: +1q, +15q, +17. Dagegen kommen bei den Ausbreitungen pT2, pT3 und pT4 zusätzliche Aberrationen vor, die bei der Tumorausdehnungen pT1 nicht zu finden sind. Bei diesen Veränderungen handelt es sich überwiegend um Verluste chromosomaler Bereiche: -1p, -4q, -5q, -6q, -8q, -13q, -Xp, -Xq, +6p, +16p, +20q.

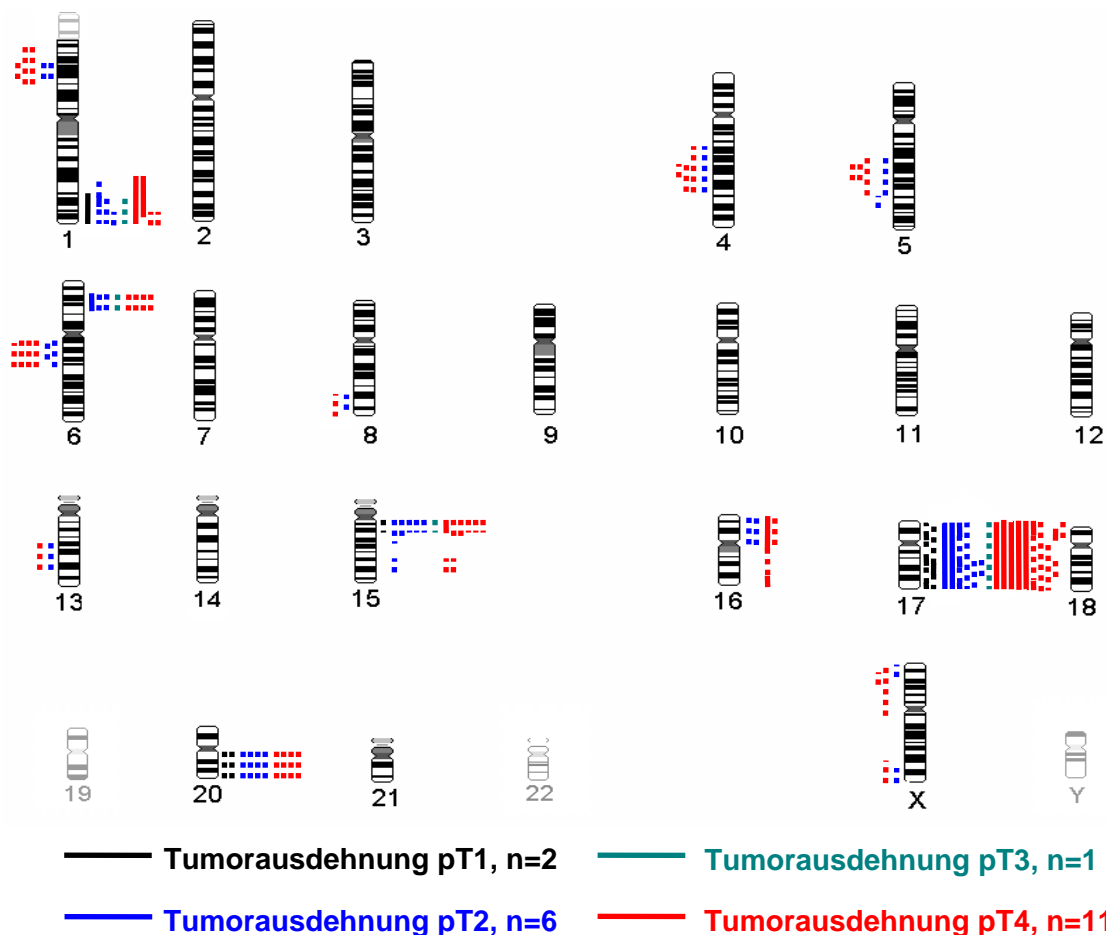


Abbildung 13: Imbalancen der PTC gruppiert nach Tumorausdehnung

Jede (gestrichelte) Linie repräsentiert eine Aberration. Linien auf der rechten Seite der Chromosomen kennzeichnen Zugewinne, solche auf der linken Seite Verluste. Durchgezogen gezeichnete Linien stehen für sichere Aberrationen, gestrichelt gezeichnete Linien für Daten geringerer Sicherheit. Blass gezeichnete Chromosomen 19, 22, Y und 1p32-pter wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

6.8 Zuordnung chromosomaler Imbalancen zu Krankheitsstadien

Um zu prüfen, ob bestimmte Aberrationen nicht nur mit der Ausdehnung des Tumors, sondern auch mit einem Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Manifestation einhergehen, wurden zwei Patientengruppen definiert. Sechs Patienten wurden als Patienten mit frühem nichtaggressivem Krankheitsstadium charakterisiert. Diese Gruppe umfasst Kinder und Jugendliche mit einer Stadium 1- oder Stadium 2-Krankheit laut Studienprotokoll. Ihre Tumoren sind gekennzeichnet durch eine Tumorausdehnung pT1, pT2, oder pT3 (6.7.) und das Fehlen von Lymphknoten oder Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt. Jeder dieser Patienten lebt derzeit ohne Zeichen eines PTC (komplette Remission). Die verbleibenden 14 Patienten wurden als Patienten mit fortgeschrittenem aggressivem Stadium (laut Studienprotokoll Stadium 3 und 4) eines papillären Schilddrüsenkarzinoms klassifiziert. Diese Gruppe Patienten ist gekennzeichnet durch Tumoren mit einer Ausbreitung entsprechend pT1-pT4 und durch das Auftreten von Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Theoretisch zählen ebenfalls zu dieser Patientengruppe pT4-Tumoren ohne Metastasen. Die Klassifizierung ist unabhängig vom derzeitigen Krankheitsstatus der Patienten. Daher sei bemerkt, dass die Einteilung in diese Patientengruppen keine Aussage zum Zusammenhang zwischen CGH-Veränderungen und Krankheitsverlauf zulässt. Kindliche papilläre Schilddrüsenkarzinome sind bekannt einerseits für das Auftreten der Krankheit in einem fortgeschrittenen Stadium mit Lymphknoten- und Fernmetastasen und andererseits für den günstigen Krankheitsverlauf mit einer hohen Überlebensrate, auch nach Jahren (Grigsby et al., 2002).

Die Abbildung 14 fasst alle bei PTC ermittelten Aberrationen gruppiert nach Krankheitsstadien in einem Ideogramm zusammen. Sie lässt erkennen, dass die Zugewinne 1q, 6p, 15q, 17, 20q sowohl bei Patienten mit nichtaggressivem als auch mit aggressivem Krankheitsstadium auftreten. Dagegen treten bei der Gruppe mit fortgeschrittener Krankheit die Verluste 1p, 4q, 5q, 6q, 8q, 13q, Xp, Xq und der Zugewinn 16p zusätzlich auf.

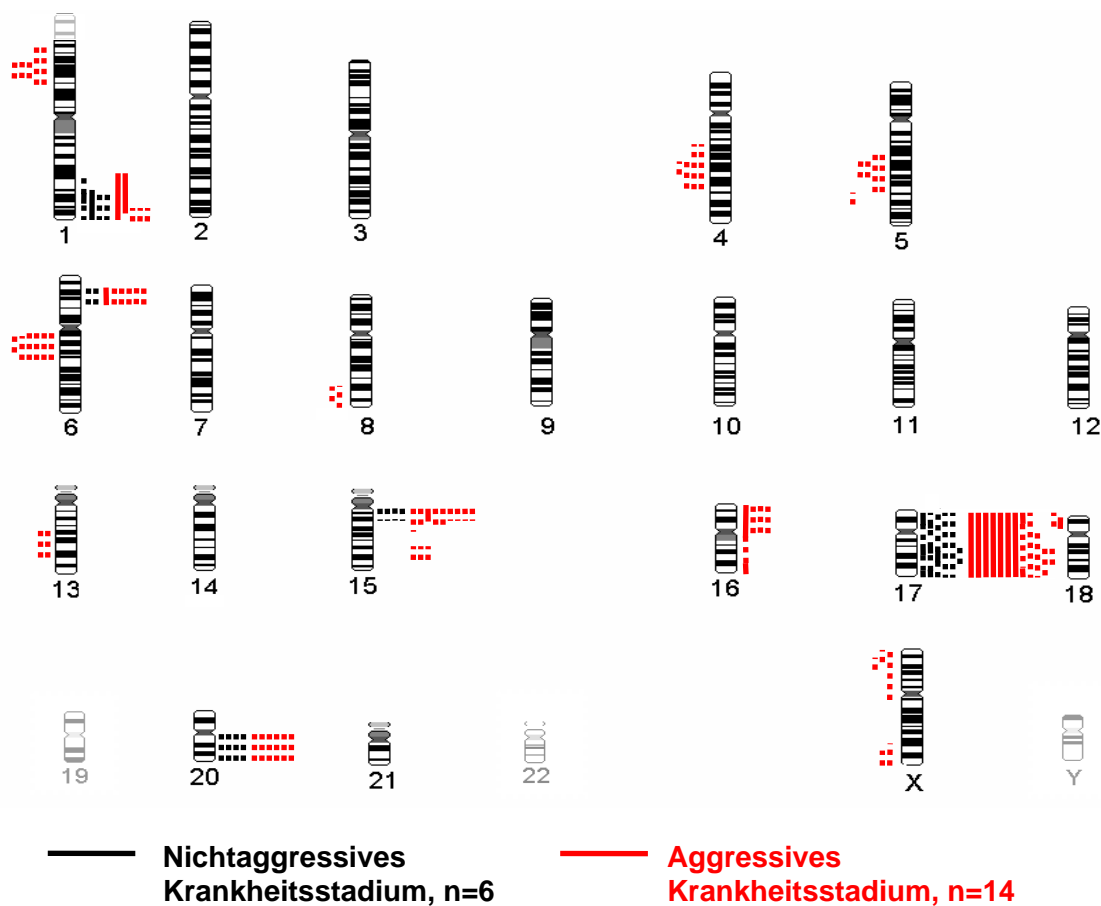


Abbildung 14: Imbalancen der PTC gruppiert nach Krankheitsstadien

Jede (gestrichelte) Linie repräsentiert eine Aberration. Linien auf der rechten Seite der Chromosomen kennzeichnen Zugewinne, Linien auf der linken Seite Verluste. Durchgezogene gezeichnete Linien stehen für sichere Aberrationen, gestrichelt gezeichnete Linien für Daten geringerer Sicherheit. Blass gezeichnete Chromosomen 19, 22, Y und 1p32-pter wurden von der Bewertung ausgeschlossen.

Die Tabelle 18 stellt die absolute (relative) Häufigkeit der chromosomalen Imbalancen aller untersuchten PTC, verglichen mit den Häufigkeiten der Aberrationen in der Gruppe mit aggressivem beziehungsweise mit nichtaggressivem Krankheitsstadium dar. In die Darstellung wurden nur die Veränderungen, die mindestens bei 4 der 20 Patienten mit PTC (20%) auftraten, einbezogen.

Die Gegenüberstellung in Tabelle 18 deckt auf, dass die am häufigsten auftretenden Zugewinne (90%, 80%, 65%) der Chromosomenarme 17q, 17p und 15q bei PTC in einem aggressiven beziehungsweise nichtaggressiven Krankheitsstadium in etwa gleich häufig auftreten (86% vs. 100% bei 17q; 79% vs. 83% bei 17p; 64% vs. 67% bei 15q). Verluste von Chromosomenteilbereichen kommen bei Tumoren von Patienten in einem frühen Krankheitsstadium nicht vor. Die Gruppe mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium zeigt dagegen in 38% aller Aberrationen

Verluste. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnte auf dem Signifikanzniveau von 5% die Nullhypothese, dass Tumoren der Patienten mit nichtaggressivem und aggressivem Krankheitsstadium im gleichen Maße Verluste chromosomaler Teilbereiche aufweisen, abgelehnt werden ($p < 0,05$). Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Verlusten und dem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Der häufigste Verlust in dieser Gruppe ist der des Teilbereichs 6q12-q15 (43%). Insgesamt weisen die Tumoren der Patienten mit einem aggressiven Stadium der Krankheit eine größere mittlere Aberrationenzahl auf (5,5 vs. 4).

Tabelle 18: Häufigkeit vorherrschender Imbalancen in Tumoren von Patienten mit aggressivem und nichtaggressivem Krankheitsstadium

Häufige CGH- Veränderung bei kindlichen PTC	Absolute Häufigkeit der Aberration (%)			p - Wert
	Patienten	Aggressives	Nichtaggressives	
	Absolut n=20	Krankheitsstadium n=14	Krankheitsstadium n=6	
+ 17q	18/20 (90)	12/14 (86)	6/6 (100)	n.s.
+ 17p	16/20 (80)	11/14 (79)	5/6 (83)	n.s.
+ 15q11.2-q14	13/20 (65)	9/14 (64)	4/6 (67)	n.s.
+ 20q	10/20 (50)	6/14 (43)	4/6 (67)	n.s.
+ 1q41-qter	9/20 (45)	5/14 (36)	4/6 (67)	n.s.
+ 6p22.1-p23	8/20 (40)	6/14 (43)	2/6 (33)	n.s.
+ 16p	4/20 (20)	4/14 (29)	0/6 (0)	n.s.
- 6q12-q15	6/20 (30)	6/14 (43)	0/6 (0)	n.s.
- 1p22.2-p31.3	5/20 (25)	5/14 (36)	0/6 (0)	n.s.
- 5q22-q23.3	5/20 (25)	5/14 (36)	0/6 (0)	n.s.
- 4q24-q27	4/20 (20)	4/14 (29)	0/6 (0)	n.s.
MAZ	4	5,5	4	n.s.
Zugewinne	67 (70) [3,5]	47 (62) [3]	20 (100) [4]	n.s.
Verluste	29 (30) [0,5]	29 (38) [1,5]	0 [0]	0,012

MAZ=mittlere Aberrationenzahl (Median), berücksichtigt wurden alle ermittelten CGH-Veränderungen; n=Anzahl der Patienten; p-Wert=Irrtumswahrscheinlichkeit; []=Median; n.s.=nicht signifikant ($p > 0,05$); die wichtigsten Ergebnisse sind fett markiert

Die Tatsache, dass die Häufigkeit chromosomaler Veränderungen bei ungünstigem Stadium des papillären Schilddrüsenkarzinoms zunimmt, wird durch Abbildung 15

schematisch illustriert. Die Graphik stellt die pro Fall ermittelte Anzahl an Aberrationen unter Berücksichtigung der gebildeten Patientengruppen dar. Jeder Balken repräsentiert den Tumor eines Patienten und dessen Anzahl an CGH-Veränderungen. Schwarze Balken stehen für PTC im frühen Stadium. Tumoren im fortgeschrittenen Stadium werden durch rote Balken gekennzeichnet, gestreifte Balken kennzeichnen die Tumoren von Patienten, bei denen Fernmetastasen diagnostiziert worden sind. Blaue Umrandungen der Balken zeigen die Aberrationenzahl von Patienten mit einer vom Auftreten des PTC unabhängigen radiotherapeutischen Behandlung in der Krankengeschichte.

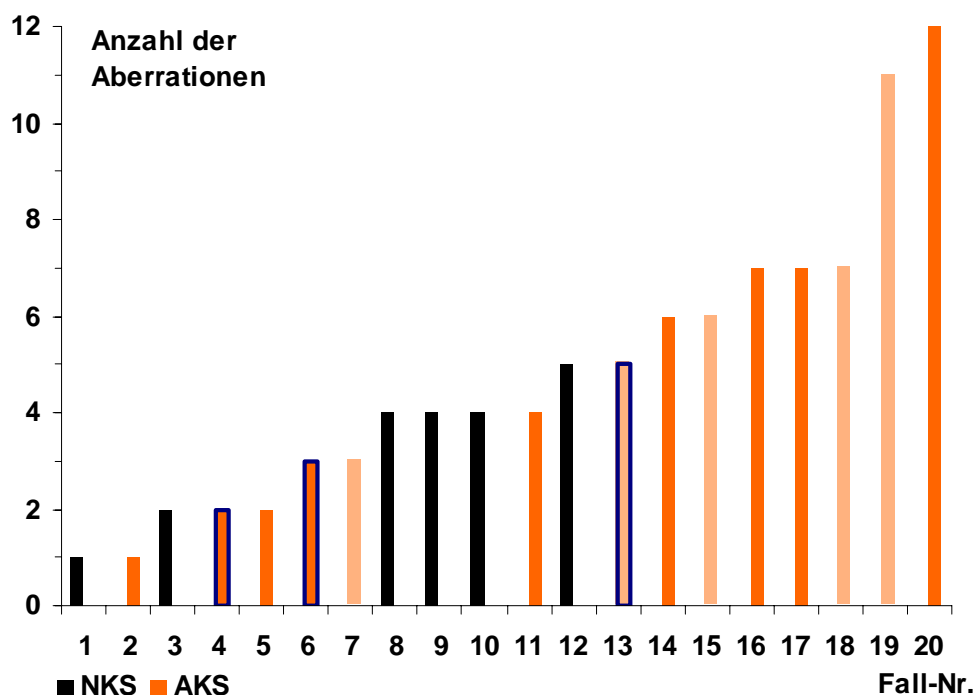


Abbildung 15: Anzahl der Aberrationen pro Fall unter Berücksichtigung der Einteilung in nichtaggressives und aggressives Krankheitsstadium

Jeder Tumor wird durch einen Balken repräsentiert. Gestreifte Balken zeigen Tumoren von Patienten mit Fernmetastasen an. Blaue Rahmen um die Balken kennzeichnen Patienten mit vorangegangener radiotherapeutischer Behandlung.

NKS=nichtaggressives Krankheitsstadium; AKS=aggressives Krankheitsstadium

Die Abbildung 15 veranschaulicht, dass die Hälfte der Patienten mit aggressivem PTC eine höhere Aberrationenzahl aufweist als alle Patienten mit nichtaggressivem PTC. Mit Ausnahme eines Tumors (Abbildung 15, Fall-Nr. 7) haben alle Tumoren von Patienten mit Fernmetastasen in Lunge oder Skelett (80%) mehr Aberrationen als die Tumoren der Patienten mit günstigem Krankheitsstadium im Durchschnitt. Patienten, die vor dem Auftreten des PTC radiotherapeutisch behandelt worden sind,

besitzen Tumoren, die aufgrund ihrer Eigenschaften zu einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium geführt haben, aber weniger Aberrationen aufweisen als die überwiegende Zahl der Tumoren in dieser Gruppe. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es wichtig, einzelne klinische Merkmale gesondert auf ihre Beziehung zu Art und Häufigkeit der Aberrationen zu untersuchen.

6.9 Chromosomale Imbalancen in Beziehung zu radiotherapeutischer Vorbehandlung, aktuellem Krankheitszustand und Auftreten von Metastasen

Im Folgenden soll geprüft werden ob PTC von Patienten mit verschiedenen prognostisch relevanten klinischen Merkmalen bestimmte CGH-Veränderungen aufweisen. Die Tabelle 19 vergleicht die Häufigkeit einzelner chromosomaler Aberrationen bei Patienten mit verschiedenen klinischen Merkmalen. Es wurde berücksichtigt, ob eine radiotherapeutische Behandlung in der Krankengeschichte vorlag, in welchem aktuellen Krankheitszustand sich die Patienten befinden und ob die Tumoren Lymphknoten- oder Fernmetastasen gebildet haben. Als Kandidatenaberrationen wurden solche Imbalancen bezeichnet, die in einer der definierten Gruppen zu mindestens 50%, in der anderen dagegen zu weniger als 15% auftraten.

Es konnte festgestellt werden, dass Tumoren der Patienten, die vor dem Auftreten des PTC radiotherapeutisch behandelt worden sind, im Mittel weniger Aberrationen aufweisen als das Tumormaterial der Patienten ohne radiotherapeutische Vorbehandlung (3 vs. 6; Tabelle 19). Außerdem treten in dieser Tumorgruppe häufige Aberrationen aggressiver PTC, +20q (55% vs. 0%) und -6q (55% vs. 0%), nicht auf.

Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraums zwischen 0,8 und 4,25 Jahren (Tabelle 17) trotz Therapie mit dem Tumor oder dessen Metastasen leben, zeigen wesentlich häufiger als Patienten in kompletter Remission Tumoren mit Verlusten in Teilbereichen der Chromosomen 1p (67% vs. 8%), 4q (67% vs. 0%), 5q (67% vs. 8%) und 6q (83% vs. 8%). Diese Imbalancen können als mögliche Kandidatenaberrationen für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf bezeichnet werden. Diese Zusammenhänge konnten darüber hinaus mit dem exakten Test nach

Fisher als signifikant bestätigt werden ($p=0,022$; $p=0,005$; $p=0,022$; $p=0,004$). Als Kandidatenaberration für einen ungünstigen Krankheitsverlauf kommt darüber hinaus der Zugewinn 16p in Frage (50% vs. 8%). Im Mittel zeigen Tumoren mit ungünstigem Verlauf signifikant mehr Aberrationen als Tumoren mit günstigem Verlauf der Krankheit (7 vs. 4; $p=0,003$). Die mittlere Anzahl der Verluste ist größer bei Tumoren von Patienten mit ungünstigem Krankheitsverlauf ($p=0,013$). Diese Beziehungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Von Kandidatenaberrationen für das Auftreten von Fernmetastasen kann man bei den Bruchstückverlusten des kurzen Arms des Chromosoms 1 und des langen Arms der Chromosomen 5 und 6 sprechen. Sie kommen bei 60% der Tumoren von Patienten mit Fernmetastasen, dagegen bei keinem Tumor von Patienten ohne Metastasen vor. Mindestens 20% der Patienten, die Lymphknotenmetastasen haben, besitzen Tumoren, die diese Aberrationen besitzen. Invasive PTC mit Fernmetastasen sind im Mittel durch mehr Aberrationen gekennzeichnet als PTC ohne Metastasen (6 vs. 4). Dabei zeigen Tumoren ohne Potenz zur Metastasierung lediglich Zugewinne, Tumoren mit Fernmetastasen weisen dagegen zu 44% einen Verlust chromosomaler Bereiche auf. Im Vergleich zu Tumoren ohne Metastasen ist das Auftreten von Verlusten signifikant häufiger bei Tumoren mit Fernmetastasen. Dieser Zusammenhang konnte mittels des Mann-Whitney-U-Tests bestätigt werden ($p=0,008$).

Tabelle 19: Chromosomale Imbalancen in Abhängigkeit von radiotherapeutischer Vorbehandlung, aktuellem Krankheitszustand und dem Vorhandensein von Metastasen

Aberration	Absolute Häufigkeit der Aberration (%)						
	RadioVorbehandlg.		Aktueller Krankheitszustand		Metastasen		
	AKS mit RadVor n=3	AKS ohne RadVor n=11	CCR n=12	PR, Stillst, Metast n=6	keine n=5	regio LK n=10	LK und FernM n=5
+ 1q	0	5 (45)	5 (42)	2 (33)	4 (80)	3 (30)	2 (40)
+ 6p	1 (33)	5 (45)	4 (33)	4 (67)	2 (40)	3 (30)	3 (60)
+ 15q	2 (67)	7 (64)	9 (75)	3 (50)	4 (80)	7 (70)	2 (40)
+ 16p	0	4 (36)	1 (8)	3 (50)	0	2 (20)	2 (40)
+ 16q	0	1 (9)	0	1 (17)	0	0	1 (20)
+ 17p	2 (67)	9 (82)	9 (75)	6 (100)	4 (80)	7 (70)	5 (100)
+ 17q	3 (100)	9 (82)	12 (100)	5 (83)	5 (100)	9 (90)	4 (80)
+ 20q	0	6 (55)	5 (42)	4 (67)	3 (60)	4 (40)	3 (60)
- 1p	0	5 (45)	1 (8) *	4 (67) *	0	2 (30)	3 (60)
- 4q	0	4 (36)	0 *	4 (67) *	0	2 (20)	2 (40)
- 5q	0	5 (45)	1 (8) *	4 (67) *	0	2 (20)	3 (60)
- 6q	0	6 (55)	1 (8) *	5 (83) *	0	3 (30)	3 (60)
- 8q	1 (33)	1 (9)	1 (8)	1 (17)	0	2 (20)	0
- 13q	0	2 (18)	0	2 (33)	0	1 (10)	1 (20)
- Xp	1 (33)	2 (18)	2 (17)	1 (17)	0	2 (20)	1 (20)
- Xq	1 (33)	1 (9)	1 (8)	1 (17)	0	1 (10)	1 (20)
MAZ	3	6	4*	7 *	4	3,5	6
Zugewinne	6 (67) [2]	41 (61) [4]	37 (84) [3]	22 (48) [4,5]	18 (100) [4]	31 (67) [2,5]	18 (56) [3]
Verluste	3 (33) [1]	26 (39) [2]	7 * (16) [0]	24 * (52) [3]	0 * (0) [0]	15 (33) [0,5]	14 * (44) [2]

RadVor=radiotherapeutische Vorbehandlung; AKS=aggressives Krankheitsstadium; CCR=komplette Remission; PR=partielle Remission; Stillst=Stillstand; Metast=Metastasen noch vorhanden; regio LK=regionale Lymphknotenmetastasen; FernM=Fernmetastasen in Lunge oder Skelett; n=Anzahl der Patienten; MAZ=mittlere Aberrationenzahl (Median); [] =Median; *=signifikanter Zusammenhang ($p<0,05$); die wichtigsten Ergebnisse sind fett markiert

6.10 Verifizierung der CGH-Ergebnisse mittels der Interphase-FISH-Analyse

Um zu prüfen, ob die hier verwendete Strategie der Auswertung der FISH-Signale in der CGH-Analyse möglicherweise falsch positive beziehungsweise falsch negative Daten produziert, wurde exemplarisch eine Verifizierung des in der CGH ermittelten Zugewinns des Chromosoms 17 vorgenommen. In den Fällen 01-014 (FTC) und 01-035 (PTC) wurde eine für das Zentromer 17 spezifische Sonde zusammen mit der zentromerspezifischen Sonde des Chromosoms 10 als Referenzsonde eingesetzt. In der CGH-Analyse zeigte das Chromosom 10 keinerlei Abweichungen vom Mittelprofil (Abbildungen 10 und 11).

Der Fall 01-014 wies im CGH-Profil einen deutlichen Zugewinn des Chromosoms 17 auf. In der Interphase-FISH-Analyse wurden bei 56 von 200 (28%) ausgezählten Kernen 3 Signale beobachtet (Abbildung 16). Eine zweite Analyse ergab in 15 von 67 (22%) bewerteten Kernen 3 Signale mit der Zentromersonde 17 und 2 Signale mit der Zentromersonde 10 (Abbildung 17). Die anderen 52 Kerne zeigten beide Zentromersignale je 2-mal. Ein für die verwendeten Zentromersonden gebräuchlicher cutoff-Wert der Analyse von Lymphozytenkernen liegt bei 4%. Dieser Wert wurde in der vorliegenden Arbeit als Schwellenwert für das Auftreten einer Aneuploidie zugrunde gelegt. Im Fall 01-014 konnte mit der Interphase-FISH-Analyse eine Trisomie 17 bestätigt werden.

Im Fall 01-035 wurde die Interphase-FISH ebenfalls mit einer Zentromersonde 17 durchgeführt, obwohl mit der CGH lediglich eine Vervielfachung des Bereichs 17q21.2-q24 ermittelt worden war. Dennoch konnte die Zentromersonde 17 bei 10% der 200 ausgezählten Kerne 3 Signale erzeugen (Abbildungen 18 und 19). Der festgelegte Schwellenwert von 4% wurde damit überschritten. Aufgrund der Interphase-FISH-Analyse muss deshalb das CGH-Ergebnis korrigiert werden. Der Zugewinn im Fall 01-035 betrifft nicht nur den Bereich 17q21.2-q24, sondern umfasst auch das Zentromer 17, so dass man von einer Trisomie 17 sprechen kann. Sie lässt sich jedoch nur in einer sehr geringen Zahl der Kerne nachweisen, was für eine starke Heterogenität der Tumorzellen spricht. Diese Heterogenität konnte mittels der CGH nicht erfasst werden, da die CGH lediglich die durchschnittliche Veränderung in der Kopienzahl berücksichtigt.

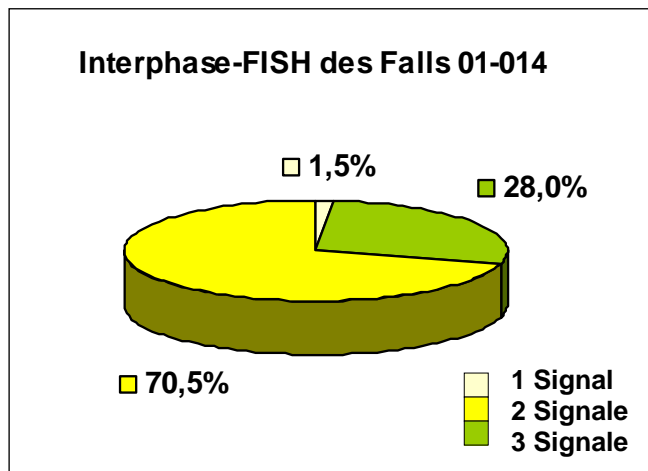


Abbildung 16: Häufigkeit der Zentromer-17-Signale nach Interphase-FISH (Fall 01-014)
28% der 200 ausgezählten Kerne weisen 3 Signale des Zentromers 17 entsprechend einer Trisomie auf

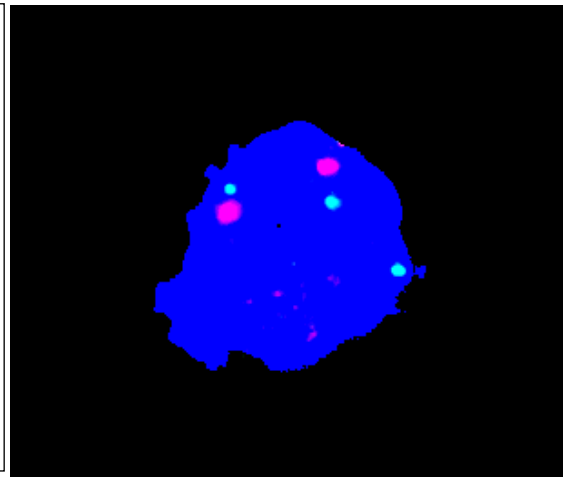


Abbildung 17: Zentromersignale der Chromosomen 10 (rot) und 17 (grün) nach FISH an Interphasekernen (Fall 01-014)
Kern durch DAPI-Gegenfärbung blau

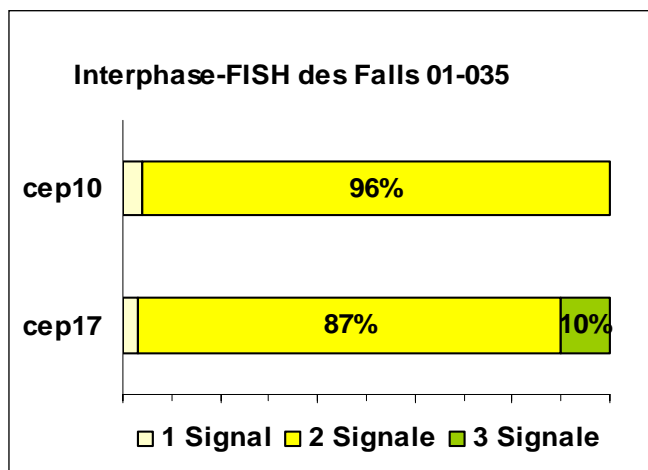


Abbildung 18: Häufigkeit der Zentromer-17- und der Zentromer-10-Signale nach Interphase-FISH (01-035)
10% der 200 ausgezählten Kerne weisen 3 Signale des Zentromers 17 entsprechend einer Trisomie auf

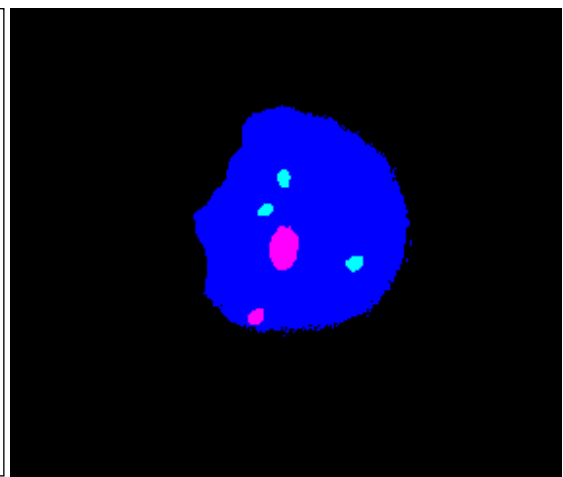


Abbildung 19: Zentromersignale der Chromosomen 10 (rot) und 17 (grün) nach FISH an Interphasekernen (Fall 01-035)
Kern durch DAPI-Gegenfärbung blau

6.11 Gemeinsame und unterschiedliche chromosomale Imbalancen von FTC und PTC

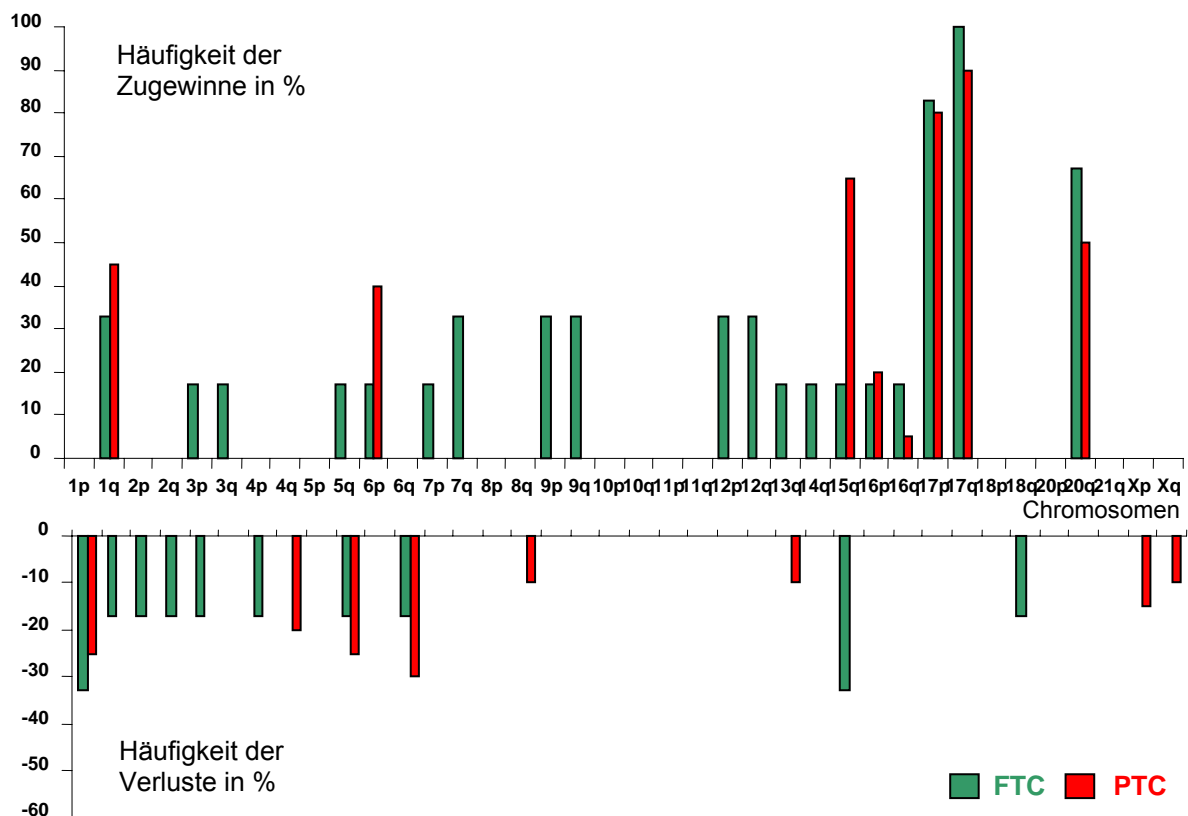
Verschiedene Veröffentlichungen unterstützen mit Daten von molekular- und zytogenetischen Untersuchungen die Annahmen, dass es grundsätzliche Unterschiede in der Pathogenese der follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinome gibt (Learoyd et al., 2000; Hemmer et al. 1999) und dass es sich bei den beiden histologischen Subtypen der Schilddrüsenneoplasien um verschiedene Entitäten handelt (Hemmer et al., 1999). Um diese Annahmen bei kindlichen Schilddrüsenkarzinomen zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die CGH-Aberrationen der FTC und PTC miteinander verglichen.

Es konnte festgestellt werden, dass beide Subtypen DNA-Veränderungen in allen auswertbaren Fällen aufwiesen. Das Verhältnis von Zugewinnen zu Verlusten betrug sowohl bei FTC als auch bei PTC 2,3:1 (70% zu 30%). Pro Fall zeigten die FTC eine größere mittlere Aberrationenzahl als die PTC (Median 5,5 vs. 4). Die chromosomalen Imbalancen der FTC verteilten sich auf ein breiteres Spektrum von Chromosomen als die der PTC (16 vs. 11). Für beide Entitäten wurden gemeinsame häufige Aberrationen ermittelt. Diese waren Zugewinne der Chromosomenarme 17q, 17p, 20q und 1q (Tabelle 20, Abbildung 20; Häufigkeiten über 30%). Der Zugewinn des chromosomalen Teilbereichs 15q trat häufiger bei PTC auf (65% vs. 17%). Dagegen waren Zugewinne der Chromosomenarme 7q, 9p, 9q, 12p, 12q (alle 33%) und der Verlust eines Teils des Chromosoms 15 (33%) nur bei FTC zu beobachten. Tabelle 20 fasst die ermittelten CGH-Ergebnisse der FTC und PTC vergleichend zusammen. Es wurden die Anzahl aller CGH-Veränderungen, das Verhältnis von Zugewinnen zu Verlusten berücksichtigt und die häufigsten Aberrationen (relative Häufigkeit > 30%) beider Entitäten aufgeführt. Abbildung 20 zeigt den graphischen Vergleich der relativen Häufigkeiten der chromosomalen Imbalancen der FTC und PTC.

Tabelle 20: Art und Häufigkeit chromosomaler Imbalancen bei FTC und PTC im Vergleich

	Anzahl aller CGH-Veränderungen	Anzahl der CGH-Veränderungen (%)		Häufige CGH-Veränderungen (% der Fälle)
		Zugewinne	Verluste	
FTC	36; n=6	25 (69%)	11 (31%)	+17q (100%), +17p (83%), +20q (67%), +1q (33%), +7q (33%), +9 (33%), +12 (33%), -1p22.3-p35 (33%), -15q25-qter (33%)
PTC	96; n=20	67 (70%)	29 (30%)	+17q (90%), +17p (80%), +15q11.2-q14 (65%), +20q (50%), +1q41-qter (45%), +6p22.1-p23 (40%), -6q12-q15 (30%)

FTC=follikuläres Schilddrüsenkarzinom; PTC=papilläres Schilddrüsenkarzinom; n=Anzahl der Patienten

**Abbildung 20: Vergleich der chromosomalen Imbalancen der FTC und PTC**

Jeder Balken repräsentiert die relative Häufigkeit der entsprechenden Aberration in einer Gruppe. PTC sind durch rote Balken, FTC durch grüne Balken gekennzeichnet. Beide Tumorentitäten besitzen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede im CGH-Profil.

7 Diskussion

7.1 Methodische Aspekte der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

Die erstmals von Kallioniemi et al. (1992) beschriebene Komparative Genomische Hybridisierung ist eine molekularzytogenetische Methode, die es ermöglicht das gesamte Genom eines Tumors auf chromosomale Imbalancen zu untersuchen. Dafür werden genomische Tumor- und Referenz-DNA, sowie Metaphasepräparate von Lymphozyten eines gesunden Spenders benötigt. Mit der CGH können unbekannte Genomveränderungen solider Tumoren, deren Kultivierung und Chromosomenpräparation schwierig beziehungsweise unmöglich ist, aufgedeckt werden. Die Entstehung von genetischen Aberrationen während der Langzeitzellkultur spielt dadurch bei der CGH keine Rolle. Seit der Einführung der Methode 1992 wird die CGH zur Ermittlung von Aberrationen fast aller Tumorarten angewandt (zusammengefasst durch Struski et al., 2002). Durch die Kombination der CGH mit einer universellen DNA-Amplifikation (Telenius et al., 1992) wurde von Speicher et al. (1993) eine Methode aufgezeigt, formalinfixiertes, paraffineingebettetes Tumormaterial auf Genomveränderungen zu untersuchen. Die Möglichkeit zytogenetische Daten von archiviertem Gewebematerial mit histologischen und klinischen Daten zu vergleichen, ließ das Wissen über solide Tumoren und deren phänotypische Ausprägung in den letzten Jahren stark wachsen. Dennoch weist die CGH einige Probleme und Grenzen auf. Eine Beurteilung von perizentrischen und heterochromatischen Regionen ist aufgrund der Vielzahl repetitiver Sequenzen nicht möglich (Kallioniemi et al., 1994). Sie werden mit Human-Cot-1-DNA abgeblockt. Kallioniemi et al. (1994) beschreiben außerdem die Bereiche 1p32-pter, 16p, 19 und 22 als anfällig für eine falsch positive Interpretation von Verlusten. In dieser Arbeit wurden auf der Grundlage von Literaturdaten und eigenen Kontrollexperimenten die Zentromer-, Telomer- und Heterochromatinbereiche, sowie die Chromosomen 19, 22, Y und die chromosomale Region 1p32-pter als artefaktanfällig bewertet. Reproduzierbare Verschiebungen des Fluoreszenzintensitätsprofils in der CGH-Analyse wurden in diesen chromosomalen Regionen bei fast allen Tumoren und bei Kontrollexperimenten mit ausschließlich Normal-DNA beobachtet. Durch den vertauschten Einsatz der Fluorochrome in einer

Hybridisierung konnte ausgeschlossen werden, dass die Abweichung der Fluoreszenzintensität vom Mittelprofil in diesen Bereichen auf einen verschiedenen guten Einbau unterschiedlich markierter dUTPs in der Markierungs-PCR zurückzuführen ist. Der Einsatz verschiedener Referenz-DNA, aber gleicher Test-DNA führte in den artefaktgefährdeten Regionen zu ungleich starken Abweichungen vom Mittelprofil. Hybridisierungen mit Test- und Referenz-DNA derselben Person zeigten dagegen keine Abweichungen vom Mittelprofil. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die Artefakte durch die interindividuelle Variabilität der Anzahl repetitiver Sequenzen in diesen Regionen verursacht werden. Die genannten Bereiche wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Damit CGH-Veränderungen verlässlich ermittelt werden können, sollte der Anteil der DNA normaler Zellen in der untersuchten Probe nicht größer als 50% sein. Diesem Aspekt wurde in der zugrunde liegenden Arbeit Rechnung getragen, indem eine histologische Färbung und Begutachtung der Gewebsschnitte erfolgte und für die DNA-Isolierung ausschließlich auf diese Weise identifizierte Tumoranteile verwendet wurden. Da die CGH nur die durchschnittlichen Veränderungen in der Kopienzahl eines Gewebes erkennt, bleibt die mögliche Heterogenität in einem Tumor unbeachtet (Kallioniemi et al., 1994). Subklone mit unterschiedlichem Aberrationsmuster, wie sie im Fall 01-035 (6.10) vermutet werden können, werden nicht erkannt. Daher ist eine Verifizierung uneindeutiger CGH-Ergebnisse mit einer Interphase-FISH-Analyse zu empfehlen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte sie in zwei Fällen.

Die CGH aus formalinfixiertem Paraffinmaterial hat trotz ihrer Bedeutung für die retrospektive Analyse von archivierten Gewebeproben Nachteile gegenüber der Arbeit mit frischen Tumorproben. Mit zunehmender Zeit der Formalinfixierung des Tumorgewebes nimmt der Degradierungsgrad der DNA zu und die Ausbeute hochmolekularer DNA ab (Speicher et al., 1993; Isola et al., 1994). Die Formalinfixierung bewirkt ein Cross-linking der Kernproteine, eine Entstehung von Haftungskomplexen zwischen der DNA und den Proteinen und eine Fragmentierung der DNA (Isola et al., 1994). Durch die Verwendung von gepuffertem Formalin kann der Grad der DNA-Degradierung verringert werden. Die Formalinfixierung wurde von verschiedenen pathologischen Instituten vorgenommen, so dass auf die Art und Dauer der Formalinfixierung kein Einfluss genommen werden konnte. Durch einen mindestens 14-stündigen Proteinase-K-Verdau bei der DNA-Extraktion wurde eine

gute DNA-Ausbeute erreicht. Durch die Anwendung der Markierungs-PCR anstelle der Nicktranslation als Standardmarkierungsmethode wurde einer weiteren DNA-Verkürzung entgegengewirkt.

In der Literatur lassen sich verschiedene Auffassungen bezüglich der Festlegung der Auswertungsstrategie der CGH-Daten finden. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten zur Ermittlung von Chromatinzugewinnen oder –verlusten. Eine Variante basiert auf festgelegten Schwellenwerten. Eine Abweichung des Mittelprofils über $\pm 20\%$ von dem entlang aller Chromosomen berechneten Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten hinaus wird als Aberration gewertet. Die andere Variante bedient sich statistischer Konzepte und betrachtet in jeder chromosomalen Region die dreifache Standardabweichung vom Verhältniswert der mittleren Fluoreszenzintensitäten aller Chromosomen als Schwelle ab der chromosomale Imbalancen sichtbar werden. Barth et al. (2000) beschreiben, dass definierte Schwellenwerte zu einer hohen Zahl falsch negativer Werte führen, sich also durch eine hohe Spezifität auszeichnen. Auf statistischen Methoden beruhende Grenzwerte zeigen dagegen viele falsch positive Ergebnisse und damit eine erhöhte Sensitivität (Barth et al., 2000). Um mittels der CGH sensitiv Zugewinne oder Verluste aufzudecken, wurden feste Schwellenwert als nicht optimal bewertet (Du Manoir et al., 1995). Da sie sich aber durch eine höhere Reliabilität der positiven Ergebnisse auszeichnen, werden sie von Barth et al. (2000) empfohlen. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Grenzwerte bei der Auswertung der CGH-Veränderungen berücksichtigt (5.4.5) und die damit erhaltenen Daten graphisch unterschiedlich dargestellt (6.1). Dadurch und durch die Reproduktion der Ergebnisse in einem zweiten Experiment mit einer anderen Referenz-DNA, wurden sowohl einer hohen Spezifität, als auch einer hohen Sensitivität Rechnung getragen. Eine möglicherweise durch die Berücksichtigung der dreifachen Standardabweichung als Schwellenwert entstandene höhere Rate falsch positiver Ergebnisse wurde bewusst in Kauf genommen.

7.2 Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC)

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom ist ein seltenes differenziertes Schilddrüsenkarzinom. Das FTC gilt in der Erwachsenenmedizin als der metastasierungsfreudigere und aggressiver wachsende histologische Typ der differenzierten Schilddrüsenkarzinome (Samaan et al., 1992). Parlowsky et al. (1996) stellten in ihrer retrospektiven Analyse von Kindern mit malignen endokrinen Neoplasien fest, dass Kinder mit FTC signifikant weniger unter Metastasen und damit unter einer weniger aggressiven Krankheit leiden als Kinder mit PTC. Die FTC von Kindern und Erwachsenen scheinen sich hinsichtlich des Wachstumsverhaltens zu unterscheiden. Daher stellt sich die Frage, ob ein Unterschied zwischen beiden Altersgruppen auch auf chromosomaler Ebene zu finden ist.

In der vorliegenden Studie wurden 6 follikuläre Schilddrüsenkarzinome von Kindern und Jugendlichen auf chromosomale Imbalancen untersucht. Allen analysierten FTC gemeinsam, und damit für diese Patientengruppe charakteristisch, ist der Zugewinn des chromosomalen Teilbereichs 17q (100%). Weitere häufig wiederkehrende Aberrationen sind die Zugewinne in den Bereichen 17p (83%) und 20q (67%). Daneben zeigen kindliche FTC eine Vielzahl verschiedener Aberrationen mit geringerer Häufigkeit. Diese sind unter anderem die Zugewinne 1q (33%), 7q (33%), 12p (33%) und 12q (33%) und der Verlust 1p (33%). Struski et al. (2001) beschreiben in ihrem Review keinen Tumor, der gleichzeitig die Zugewinne 17p und 17q in über 70%, sowie den Zugewinn 20q in über 50% der Fälle aufweist, so dass diese als charakteristisch für kindliche FTC gewertet werden können.

Will man die vorliegenden Daten im Zusammenhang mit den bisherigen Erkenntnissen über FTC betrachten, so muss man sich auf Studien erwachsener Patienten beziehen, da bis dato keine veröffentlichten Analysen von FTC im Kindesalter vorliegen. Die CGH-Ergebnisse von veröffentlichten Erwachsenenstudien differieren jedoch deutlich (Tabelle 21 und Abbildung 21). Zum einen beschreiben die vier hier verglichenen Studien unterschiedliche chromosomale Imbalancen als am häufigsten vorkommend (Chen et al., 1998: +1p; Frisk et al., 1999: – 9q; Hemmer et al., 1999: – 22q; Tallini et al., 1999: +19q). Zum anderen berichten sie von verschiedenen Aberrationsindices (mittlere Anzahl der Aberrationen pro Fall), die von 1 (Frisk et al., 1999) beziehungsweise 1,5 (Chen et al., 1998; Hemmer et al., 1999) bis 6,5 (Tallini et al., 1999) variieren. Eine weitere Diskrepanz stellt der nur von

Hemmer et al. (1999) in dieser Deutlichkeit beschriebene Verlust 22q (40%) dar. Die veröffentlichten Studien zeigen also kein einheitliches Bild und liefern somit eine diffizile Grundlage für einen Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten kindlicher FTC.

Die Analyse auf zytogenetische Gemeinsamkeiten kindlicher und adulter FTC zeigt, dass die bei kindlichen FTC vorherrschenden Zugewinne +17q, +17p und +20q (100%, 83%, 67%) auch in CGH-Analysen Erwachsener beschrieben werden, jedoch nicht in der den kindlichen FTC entsprechenden Häufigkeit (15-50%, 5-25%, 5-25%; relative Häufigkeit aller 4 Studien 20%, 10%, 7%). Die weniger häufigen Aberrationen +1q, +7q, +12p und +12q (alle 33%) kindlicher FTC treten dagegen bei einer ähnlich großen Prozentzahl adulter FTC auf (8-50%, 10-50%, 8-50%, 8-50%; relative Häufigkeit aller 4 Studien 20%, 14%, 12%, 17%). Lediglich Chen et al. (1998) fanden in der kleinen, von ihnen untersuchten Patientenpopulation kein FTC mit mindestens einer der chromosomalen Aberrationen +7q, +12p, +12q, +17p, +17q und +20q. Damit unterscheiden sich deren Ergebnisse aber nicht nur von den Resultaten der vorliegenden Analyse, sondern auch von denen der anderen CGH-Studien.

Karyotypanalysen konnten bisher genauso wenig wie die CGH-Studien ein einheitliches Aberrationsmuster für FTC Erwachsener aufdecken. Dennoch wurden in einer Vielzahl von Karyotypanalysen follikulärer Adenome und Karzinome bestimmte chromosomale Aberrationen übereinstimmend häufig beobachtet (Pierotti et al., 1996). Dazu gehört die Trisomie 7, die von Belge et al. (1994) als eine primäre zytogenetische Aberration der follikulären Schilddrüsenneoplasien Erwachsener beschrieben wurde. Weitere Arbeiten fanden die Trisomie 7 bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen in Kombination mit Zugewinnen anderer Chromosomen, vor allem der Chromosomen 5, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 20 (Herrmann et al., 1991; Roque et al., 1993; Roque et al., 1998). Es besteht die Annahme, dass diese Veränderungen bei einem Teil der benignen und malignen follikulären Schilddrüsenneoplasien Erwachsener als sekundäre Aberrationen in der Tumorentwicklung eine Rolle spielen (Roque et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde bei zwei minimal invasiven FTC eine den beschriebenen Veröffentlichungen entsprechende Kombination von Zugewinnen chromosomaler Bereiche beobachtet. Fall 01-049 zeigt neben einem Zugewinn im langen Arm des Chromosoms 7 Zugewinne der Chromosomen 5q, 9, 12, 17q, 20q. Fall 02-005 zeigt ebenfalls neben weiteren Aberrationen Zugewinne der Chromosomen 7, 9, 12, 13, 14, 16, 17.

Berücksichtigt man sowohl die veröffentlichten CGH-Daten als auch die betrachteten Karyotypanalysen so kann man feststellen, dass bei einem Teil der kindlichen FTC die gleichen zytogenetischen Aberrationen auftreten wie bei den adulten FTC, wenn auch mit teilweise differierenden Häufigkeiten. Diese Veränderungen betreffen vor allem die chromosomalen Regionen 1q, 7q, 12p, 12q, 17p, 17q und 20q.

Neben den genannten gemeinsamen Aberrationen haben kindliche und adulte FTC eine Vielzahl unterschiedlicher Veränderungen. Als deutlichen Unterschied zu den Erwachsenen zeigt das kindliche FTC einen Zugewinn des Chromosoms 9 (2/6, 33%) und einen Verlust in der kleinsten gemeinsam deletierten Region 15q25-qter (2/6, 33%). Die dargestellten CGH-Studien adulter FTC beschreiben weder den Zugewinn 9q, noch den Verlust 15q (Abbildung 21). Lediglich der Zugewinn 9p wurde von Hemmer et al. (1999) bei einem der 20 (5%) untersuchten FTC festgestellt (Tabelle 21). Der Zugewinn des Chromosoms 9 und der Verlust 15q könnten daher im Zusammenhang mit dem milderen Krankheitsverlauf der FTC im Kindesalter gegenüber dem meist aggressiven Verlauf im Erwachsenenalter stehen. Roque et al. (2003) beschrieben den mit der CGH ermittelten Verlust von 15q bereits als signifikant für das Auftreten follikulärer Adenome im Gegensatz zu follikulären Karzinomen. Dies gibt Hinweis darauf, dass ein Teil der kindlichen FTC den follikulären Adenomen der Schilddrüse Erwachsener auf chromosomaler Ebene und im milden Krankheitsverlauf gleicht. Diese Thesen stützen sich jedoch auf sehr kleine untersuchte Fallzahlen, so dass sie durch das Erheben weitere Daten untermauert werden sollten.

Andere zytogenetische Studien adulter FTC weisen auf weitere häufig betroffene chromosomale Regionen hin. Roque et al. (1993) berichten von einer Deletion 3p25-pter in einem primären follikulären Karzinom und seiner Metastase. Jenkins et al. (1990) beschreiben das Chromosom 3 betreffende balancierte Rearrangements. Auch LOH-Studien adulter FTC lassen die Deletion 3p25.3-pter erkennen und vermuten, dass auf dem Chromosom 3 gelegene Tumorsuppressorgene eine wichtige Rolle in der Pathogenese der FTC spielen. Sie unterstützen die These, dass diese Deletion spezifisch für FTC und deren Progression vom Adenom zum Karzinom ist, da sie weder bei follikulären Schilddrüsenadenomen noch bei papillären Schilddrüsenkarzinomen gefunden wurde (Herrmann et al., 1991; Rodrigues-Serpa et al., 2003). Interessanterweise zeigt unter den CGH-Analysen nur die von Tallini et al. (1999) einen Verlust der chromosomalen Region 3p bei einem

adulten FTC. Ebenso wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich bei einem kindlichen FTC (Fall 01-028) ein Verlust 3p festgestellt. Die Tatsache, dass eine Vielzahl von Karyotypanalysen und LOH-Studien die Deletion 3p25-pter als spezifisch für adulte FTC beschreiben, CGH-Analysen einen Verlust 3p jedoch nur selten ermitteln, ist unter Umständen auf methodische Grenzen, wie das zu geringe Auflösungsvermögen der CGH, zurückzuführen. Es stellt sich die Frage, ob kindliche FTC ebenfalls eine Deletion 3p, die mit der CGH nicht nachgewiesen werden kann, aufweisen. Studien, die kindliche FTC hinsichtlich des LOH 3p25 untersuchen, sind daher zu empfehlen.

In den aberranten chromosomalen Bereichen können Kandidatengene liegen, die in der Pathogenese von FTC eine Rolle spielen. In der Literatur findet man als überzeugendes Kandidatengen für die Entwicklung eines FTC auf 7p12.3-p12.1 den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR beschrieben. Marti et al. (2001) konnten in follikulären Adenomen und Karzinomen der Schilddrüse eine Kernaktivität für EGFR nachweisen. Der Zugewinn 7p bei einem der sechs untersuchten FTC (02-005) gibt Hinweis auf eine Vervielfachung des EGFR in diesem Tumor. Das RAD51 Gen, ein menschliches Homolog zu dem RECA Gen von Bakterien, ist lokalisiert auf 15q15.1. Es ist einbezogen in die Reparatur von DNA-Brüchen und die Erhaltung der genomischen Stabilität. Der Verlust des langen Arms des Chromosoms 15 in einem von sechs untersuchten Fällen (01-028) weist auf den Verlust eines RAD51 Gens und damit auf eine mögliche Beteiligung in der Entstehung des FTC hin.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass adulte FTC in der Summe der Daten verschiedener Studien ein vielfältiges und kein charakteristisches Aberrationsmuster aufweisen. Ein Vergleich dieser Daten mit denen der kindlichen FTC lässt gemeinsame und unterschiedliche Aberrationen im gleichen Rahmen erkennen wie sie innerhalb der Erwachsenentumoren gefunden werden. Aus zytogenetischer Sicht ist daher mit der vorhandenen Datenlage keine klare Abgrenzung der kindlichen von den adulten FTC möglich. Der Zugewinn von 17q, der bei 100% der kindlichen FTC gefunden wurde, erscheint jedoch pathognomonisch. Er kann als Hinweis auf eine Aberration, die mit einem bestimmten Pathogeneseweg verbunden ist, gewertet werden. Da alle untersuchten kindlichen FTC ähnliche klinische Charakteristika aufweisen, konnte kein Zusammenhang zwischen einer der ermittelten Aberrationen und einem bestimmten Krankheitsverlauf festgestellt werden.

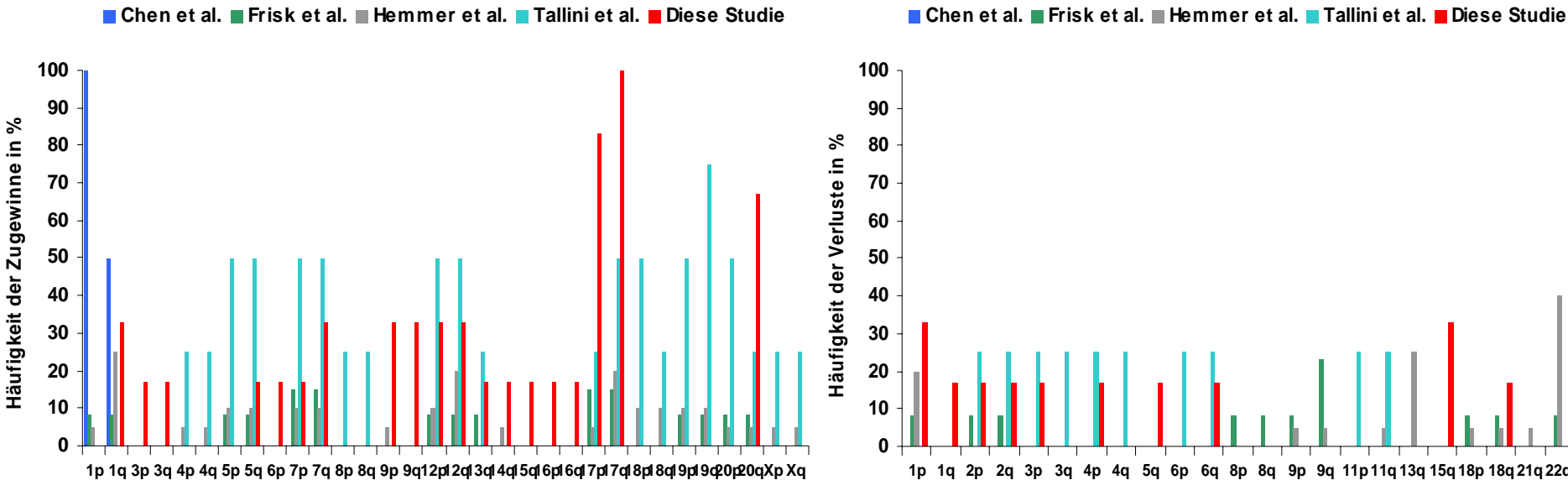
Tabelle 21: Chromosomale Imbalancen bei Kindern und Erwachsenen mit FTC im Vergleich (Literaturdaten und eigene Daten)

Autor	Z mit/ Z	Zugewinne																															
		1p	1q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	7p	7q	8p	8q	9p	9q	12p	12q	13q	14q	15q	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	Xp	Xq
Chen et al., 1998	4/4	4	2																														
Frisk et al., 1999	7/13	1	1					1	1		2	2					1	1	1					2	2			1	1	1	1		
Hemmer et al., 1999	16/20	1	5			1	1	2	2		2	2			1		2	4		1				1	4	2	2	2	2	1	1	1	1
Tallini et al., 1999	3/4					1	1	2	2		2	2	1	1			2	2	1					1	2	2	1	2	3	2	1	1	1
Diese Studie	6/6		2	1	1				1	1	1	2			2	2	2	2	1	1	1	1	1	5	6							4	

Autor	Z mit/ Z	Verluste																						
		1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5q	6p	6q	8p	8q	9p	9q	11p	11q	13q	15q	18p	18q	21q	22q
Chen et al., 1998	4/4																							
Frisk et al., 1999	7/13	1		1	1								1	1	1	3					1	1		1
Hemmer et al., 1999	16/20	4													1	1			5		1	1	1	8
Tallini et al., 1999	3/4			1	1	1	1	1	1		1	1				1	1							
Diese Studie	6/6	2	1	1	1	1		1		1		1							2		1			

Z mit=Patientenzahl mit Aberrationen; Z=Gesamtzahl der untersuchten Patienten

Abbildung 21: CGH-Daten Erwachsener mit FTC und eigene CGH-Ergebnisse kindlicher FTC



7.3 Papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC)

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste histologische Typ der differenzierten Schilddrüsenkarzinome sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter. Obwohl PTC von Kindern und Jugendlichen häufig ein fortgeschrittenes Tumorstadium und eine große Anzahl von Lymphknoten- und Fernmetastasen zeigen (Zimmerman, 1988; Travagli et al., 1995), zeichnen sie sich im Allgemeinen durch eine gute Prognose aus. Das Auftreten später Rezidive kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Schlumberger et al., 1987). Klinisch-pathologische Studien über differenzierte Schilddrüsenkarzinome im Erwachsenenalter haben bereits Indikatoren, wie Alter, extrathyroidale Invasion, Tumorgroße, Fernmetastasen und geringe Differenzierung der Tumoren, für eine ungünstige Prognose beschrieben (Shah et al., 1992; Akslen, 1993). Die konventionellen klinischen Marker besitzen aber nur begrenzt Vorhersagekraft (Kitamura et al., 2000).

Um Klinikern wichtige Entscheidungshilfen bezüglich der Radikalität der Operation und Therapie an die Hand zu geben, sind sowohl Langzeitkontrollen der Patienten als auch konkretere Marker, die Vorhersagen zum postoperativen Krankheitsverlauf gestatten, notwendig.

Die vorliegende Arbeit ist die erste CGH-Analyse kindlicher PTC. Die bisherigen zytogenetischen Daten stammen aus Studien erwachsener Patienten mit PTC. Studien mit einer Patientenpopulation im Alter unter 18 Jahren sind bis dato selten. In der zugrunde liegenden Analyse wurden in allen 20 auswertbaren Fällen (100%) genetische Aberrationen entdeckt. Diese Zahl ist im Vergleich zu veröffentlichten CGH-Studien relativ hoch. Die Prozentzahl der untersuchten Tumoren mit Aberrationen variiert allerdings in den bekannten Erwachsenenstudien zwischen 12% und 88% (Chen et al., 1998; Hemmer et al., 1999; Singh et al., 2000; Kjellman et al., 2001). Erwachsenenstudien mit Karyotypanalysen berichten lediglich in 27% der untersuchten Fälle (19 von 70) von genetischen Veränderungen (Pierotti et al., 1996), wobei sie gehäuft balancierte Rearrangements ermitteln, die mittels der CGH nicht identifizierbar sind. Eine Metaanalyse verschiedener LOH-Studien ergab, dass bei papillären Schilddrüsenkarzinomen Heterozygotieverluste generell selten auftreten (Ward et al., 1998). Die Ergebnisse der Veröffentlichungen suggerieren, dass chromosomale Instabilitäten für PTC nicht charakteristisch sind. Bei dieser

Betrachtung dürfen jedoch externe Einflussfaktoren wie Zusammensetzung (Alter, Geschlecht, usw.) und Herkunft der Studienpopulation nicht außer Acht bleiben. Die genannten Unterschiede zwischen den Veröffentlichungen und der hier vorgelegten Studie lassen die Schlussfolgerung zu, dass kindliche PTC im Gegensatz zu PTC im Erwachsenenalter im Laufe ihrer Tumorgenese häufiger Phasen chromosomaler Instabilität durchlaufen.

In der hier vorgelegten Analyse sind die häufigsten wiederkehrenden Aberrationen kindlicher PTC die Zugewinne der Chromosomenteilbereiche 17q (90%), 17p (80%), 15q11.2-q14 (65%) und 20q (50%). Sie werden von zusätzlichen Aberrationen (+1q, +6p, - 6q, - 1p, - 5q) begleitet. In dem 430 Artikel zusammenfassenden Review von Struski et al. (2001) wird kein anderer solider Tumortyp, der alle vier mit der CGH ermittelten Zugewinne +17q, +17p, +15q, +20q in einer Häufigkeit von jeweils $\geq 50\%$ aufweist, beschrieben. Diese Zugewinne scheinen also charakteristisch für kindliche PTC.

Vergleicht man die chromosomalen Imbalancen kindlicher PTC mit denen von Erwachsenen, so fallen sowohl Übereinstimmungen als auch starke Abweichungen auf (Tabelle 22, Abbildung 22). Beschreibungen adulter PTC in der Literatur umfassen wesentlich geringere Zahlen der typischen Veränderungen +17q, +17p, +15q und +20q kindlicher PTC. Lediglich 16% (17q), 4% (17p), 5% (15q) und 8% (20q) der PTC Erwachsener zeigen diese Aberrationen. Die häufigen Veränderungen +6p22.1-p23 (40%) und -6q12-q15 (30%) kindlicher PTC wurden bisher nicht in CGH-Untersuchungen Erwachsener beschrieben (Abbildung 22). Die Unterschiede zwischen CGH-Daten von Kindern und Erwachsenen können als ein Hinweis gewertet werden, dass kindliche und adulte PTC unterschiedliche Wege in der Tumorgenese bestreiten. Bereits der Altersunterschied zwischen den beiden Patientenpopulationen gibt den Tumoren der Erwachsenen einen längeren Zeitraum für die Entstehung und die Einwirkung exogener Kanzerogene auf Organe und Gewebe. Bei Erwachsenen kann es im Gegensatz zu Kindern somit eher zu einer Tumorgenese, die durch eine Akkumulation von Mutationen geprägt ist, kommen. Bei Kindern ist dagegen ein embryonaler Ursprung des PTC, wie er für die NNR-Ca bekannt ist, nicht auszuschließen. Die größte Übereinstimmung der Aberrationen von kindlichen und erwachsenen PTC findet sich für den Zugewinn 1q41-qter und den Verlust 1p22.2-p31.3 (Tabelle 22). Diese Aberrationen kommen daher als altersunabhängige Imbalancen für PTC in Frage.

Prognostische Indikatoren, die es ermöglichen, den Malignitätsgrad einzuschätzen und die postoperative Prognose korrekt vorherzusagen sind sehr wichtig für die Planung einer adjuvanten Therapie (Kitamura et al., 2000). Kjellman et al. (2001) assoziieren einen Zugewinn von 1q und einen Verlust von 9q21.3-q32 in der CGH-Analyse mit einer schlechten Prognose für den adulten Patienten mit PTC. Kitamura et al. (2000) berichten von Allel-Imbalancen im Bereich 1q, 4p, 7q, 9q und 16q, die mit dem postoperativen Tod der Patienten mit PTC einhergehen. In der zugrunde liegenden Arbeit wurden die CGH-Veränderungen im Zusammenhang mit den Kriterien für Malignität, Krankheitsstadium (umfasst die Invasivität des Tumorwachstums, 6.8) und Auftreten von Fernmetastasen, betrachtet. Um Aussagen über den postoperativen Krankheitsverlauf machen zu können, wurde ebenfalls der aktuelle Krankheitsstatus der Kinder und Jugendlichen mit PTC trotz des bisher kurzen Beobachtungszeitraums berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Analysen weichen von den zitierten Literaturdaten (Kitamura et al., 2000; Kjellman et al., 2001) ab. Der übereinstimmend ermittelte Zugewinn von 1q ist bei kindlichen PTC weder für ein aggressives Krankheitsstadium oder das Auftreten von Fernmetastasen, noch für einen ungünstigen Krankheitsverlauf signifikant. Kandidatenaberrationen für einen hohen Malignitätsgrad des kindlichen PTC sind dagegen die Verluste 1p, 4q, 5q und 6q. Sie treten bei über 25% der Patienten mit aggressivem PTC, dagegen bei keinem der Patienten mit nichtaggressivem PTC auf (6.8) und sind außerdem bei 40% (4q) beziehungsweise 60% (1p, 5q, 6q) der Tumoren mit Fernmetastasen in der Lunge oder dem Skelett vorhanden (6.9). Die Verluste 1p, 4q, 5q und 6q sind darüber hinaus signifikant ($p=0,022$; $p=0,005$; $p=0,022$; $p=0,004$) häufiger bei Patienten, die sich derzeit in einem ungünstigen Krankheitszustand (partielle Remission, Stillstand, Metastasen noch vorhanden) befinden. Sie stellen damit prognostische Marker für einen ungünstigen Verlauf kindlicher PTC dar. Die GPOH-MET-97 Studie ist noch jung und der Beobachtungszeitraum der Patienten sehr kurz. Patienten, die bisher als geheilt gelten (CCR), können noch ein Rezidiv oder Metastasen entwickeln. Die hier getroffene Bewertung sollte deswegen als ein Zwischenergebnis betrachtet werden, das nach der Beobachtung des Krankheitsverlaufs über mindestens 5 bis 10 Jahre erneut geprüft werden muss.

Die sequentielle Umwandlung von normalem Epithel zu einem invasiven Karzinom spiegelt sich in einer steigenden Zahl zellulärer und histomorphologischer Umbauten wieder. Bei verschiedenen Tumortypen konnte ein Anstieg der durchschnittlichen

Anzahl chromosomaler Veränderungen mit fortschreitendem Krankheitsstadium nachgewiesen werden (Kjellman et al., 1996; Ried et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie gehen mit dieser Theorie konform. Die mittlere Aberrationenzahl der PTC in einem aggressiven Krankheitsstadium ist größer als die der PTC in einem frühen Stadium (5,5 vs. 4). Tumoren mit Fernmetastasen zeigen mehr Aberrationen als solche ohne Potenz zur Metastasierung (Median 6 vs. 4). Tumoren von Patienten in einem ungünstigen Krankheitszustand zeichnen sich durch eine signifikant höhere Aberrationenzahl (Median 7 vs. 4; $p=0,003$) aus. Insbesondere das Auftreten von Verlusten kann sowohl mit einem aggressiven Krankheitsstadium ($p=0,012$) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen ($p=0,008$) als auch mit einem ungünstigen Krankheitszustand ($p=0,013$) in einen signifikanten Zusammenhang gebracht werden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass mit dem Malignitätsgrad die genomische Instabilität der kindlichen PTC steigt, dass heißt die Zahl der chromosomalen Veränderungen zunimmt.

Diese Ergebnisse implizieren außerdem eine mehrstufige Tumorentwicklung von einer milden zu einer aggressiven Form, wie sie von Fearon und Vogelstein (1990) für das kolorektale Karzinom beschrieben wurde. Zugewinne von 17, 15q, 20q, 1q und 6p wurden in der überwiegenden Zahl der Tumoren unabhängig vom Grad der Malignität gefunden. Sie scheinen frühe Ereignisse in der Entwicklung des Tumors zu sein. Den Zugewinn von Chromosom 17 beschrieben Zhao et al. (1999) bereits als ein frühes Ereignis in der Nebennierenrindentumorgenese. Verluste, im Speziellen von 1p, 4q, 5q und 6q, wurden in der vorliegenden Arbeit nur in PTC des fortgeschrittenen Stadiums beobachtet. In analoger Weise erlaubt dies die Hypothese, dass diese Aberrationen spät in der Entwicklung des Tumors auftreten und innerhalb eines mehrstufigen Prozesses ein aggressiveres Tumorstadium anzeigen.

Die frühkindliche Schilddrüse ist sehr strahlenempfindlich. Bekannt ist die gestiegene Inzidenz des kindlichen PTC nach der Nuklearreaktorkatastrophe in Tschernobyl 1986. Aber auch ein gehäuftes Auftreten des PTC als Zweitmalignom infolge der Bestrahlung eines embryonalen Tumors oder eines Hodgkin-Lymphoms wurden beobachtet (Tucker et al., 1991; Beral und Reeves, 1992; Inskip, 2001). Zitzelsberger et al. (1999) beschreiben nach Karyotypanalysen bisher unbekannte chromosomale Bruchpunkte in 4q, 5q, 6p, 12q, 13q und 14q bei strahleninduzierten papillären Schilddrüsenkarzinomen. Sie diskutieren diese Veränderungen als typisch für eine

strahleninduzierte Tumorentstehung bei Kindern aus Weißrussland. Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Studie zu Karyotypbeschreibungen spontaner kindlicher Schilddrüsenkarzinome. In der vorliegenden Analyse konnten mittels der CGH bei spontanen kindlichen PTC Zugewinne und Verluste in den Bereichen 4q, 5q, 6p und 13q gefunden werden. Diese Aberrationen betreffen jedoch nur Teilbereiche der Chromosomen, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit chromosomale Brüche vorliegen. Die Bruchpunkte sind mit der CGH grob erkennbar und können auf 4q25 und 4q31, 5q22 und 5q23.3, 6p22.1 und 6p23, 13q21.1 und 13q31 festgelegt werden. Sie stimmen in etwa mit den in der Karyotypanalyse von Zitzelsberger et al. (1999) genannten überein. Brüche in 4q, 5q, 6p und 13q sind also typische Veränderungen von PTC im Kindes- und Jugendalter, unabhängig von einer Strahlenbelastung in der Krankengeschichte.

Bei Patienten mit einer radiotherapeutischen Vorbehandlung wurden in der vorliegenden Studie Tumoren eines aggressiven Stadiums beobachtet. Tumoren von radiotherapeutisch behandelten Patienten zeigen jedoch nicht die für aggressive PTC typischen Aberrationen -1p, -4q, -5q, -6q. Außerdem zeichnen sie sich durch eine kleinere mittlere Aberrationenzahl als Tumoren von Patienten ohne radiotherapeutische Behandlung (3 vs. 6) aus. Die genannten Erkenntnisse unterstreichen die in der Literatur vorherrschende Annahme (Zitzelsberger et al., 1999), dass sich strahleninduzierte Tumoren von spontanen Tumoren auf zytogenetischer Ebene unterscheiden und möglicherweise unterschiedliche Tumorgeneseewege beschreiten.

Verschiedene Kandidatengene der Tumorgenese der PTC können in den mittels CGH aufgedeckten Regionen der Zugewinne und Verluste benannt werden. Auf dem chromosomalen Locus 1p31 liegt das Tumorsuppressorgen ARHI, das zu einer den ras-Protoonkogenen homologen Genfamilie gehört. Die Expression von ARHI fehlt bekanntermaßen in Zellen von Brust- und Ovarial-Karzinomen. 25% der kindlichen PTC zeigen eine Deletion 1p22.2-p31.3, die, sofern auch das zweite Allel betroffen ist, mit einem Expressionsverlust des ARHI einhergehen könnte. Der Zugewinn des chromosomalen Teilbereichs 17q tritt in der untersuchten Patientengruppe sehr häufig auf (90%). Es kommen verschiedene Kandidatengene auf Chromosom 17 für die Entwicklung der PTC in Frage. Zum einen befindet sich auf 17q11.2 das Gen für den Schilddrüsenhormonrezeptor alpha THRA. Zum anderen ist auf 17q21.1 das Protoonkogen ERBB2 (HER-2), ein Transmembranrezeptor aus der Familie der

epidermalen Wachstumsfaktoren, lokalisiert. Das HER-2 wurde von Slamon et al. (2001) in 25 bis 30% aller untersuchten Mammakarzinome überexprimiert gefunden. Eine Überexpression dieses Wachstumsfaktorrezeptors findet man außerdem bei Adenokarzinomen des Ovars, des Magens und der Speicheldrüsen. Des Weiteren ist als hot spot PRKAR1A, eine cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA), auf Chromosom 17q23-q24 bekannt. Ein Teil der RI-alpha Regulatoruntereinheit der PKA fusioniert mit der Tyrosinkinasedomäne des RET-Protoonkogens zum chimeren Onkogen PTC2 (Bongarzone et al., 1993). Bekannt sind daneben andere chromosomale Rearrangement des RET-Protoonkogens mit dem 5'Ende verschiedener Gene, die in einer Aktivierung der so genannten PTC-Onkogene resultieren und für die Entstehung des papillären Schilddrüsenkarzinoms verantwortlich gemacht werden (Heitz und Klöppel, 1997).

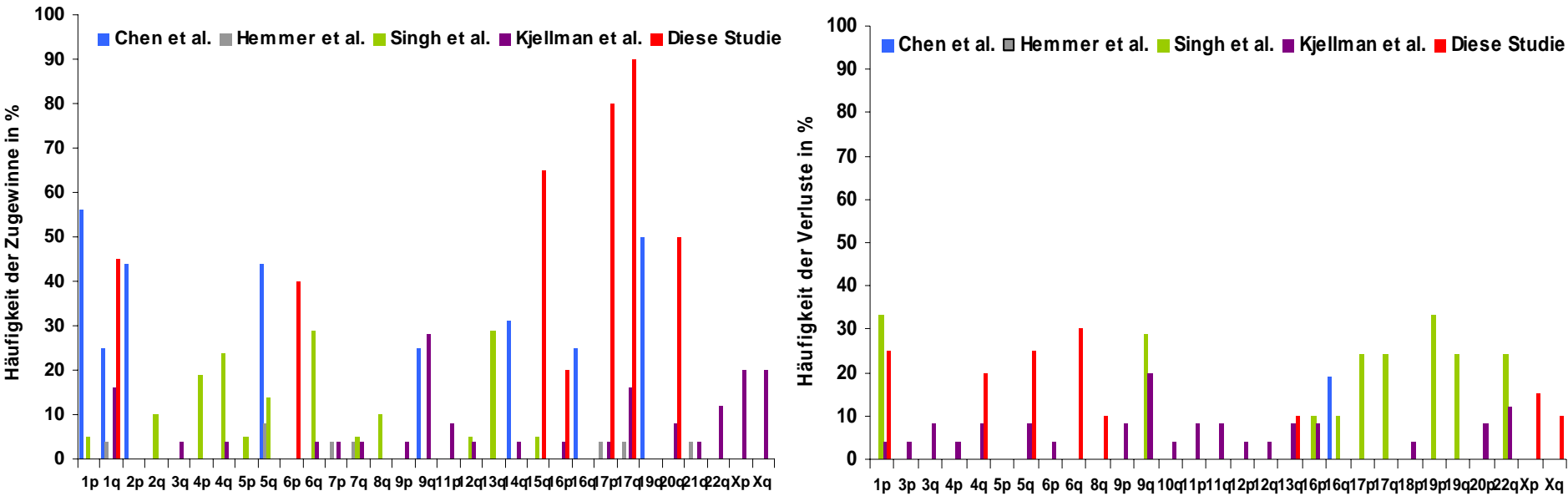
Tabelle 22: Chromosomale Imbalancen bei Kindern und Erwachsenen mit PTC im Vergleich (Literaturdaten und eigene Daten)

Autor	Z mit/ Z	Zugewinne																														
		1p	1q	2p	2q	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8q	9p	9q	11p	12q	13q	14q	15q	16p	16q	17p	17q	19q	20q	21q	22q	Xp	Xq
Chen et al., 1998	14/16	9	4	7					7							4				5			4				8					
Hemmer et al., 1999	3/26		1						2			1	1												1	1			1			
Singh et al., 2000	10/21	1			2		4	5	1	3		6		1	2				1	6		1										
Kjellman et al., 2001	21/25		4			1		1				1	1	1		1	7	2	1		1		1		1	4		2	1	3	5	5
Diese Studie	20/20		9								8											13	4		16	18		10				

Autor	Z mit/ Z	Verluste																													
		1p	3p	3q	4p	4q	5q	6p	6q	8q	9p	9q	10q	11p	11q	12p	12q	13q	16p	16q	17p	17q	18p	19p	19q	20p	22q	Xp	Xq		
Chen et al., 1998	14/16																			3											
Hemmer et al., 1999	3/26																														
Singh et al., 2000	10/21	7										6							2	2	5	5		7	5		5				
Kjellman et al., 2001	21/25	1	1	2	1	2	2	1			2	5	1	2	2	1	1	2	2				1			2	3				
Diese Studie	20/20	5				4	5		6	2								2										3	2		

Z mit=Patientenzahl mit Aberrationen; Z=Gesamtzahl der untersuchten Patienten

Abbildung 22: CGH-Daten Erwachsener mit PTC und eigene CGH-Ergebnisse kindlicher PTC



7.4 Vergleich der chromosomalen Imbalancen der Tumorentitäten FTC und PTC

Papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome werden als differenzierte Schilddrüsenkarzinome zusammengefasst. Verschiedene Veröffentlichungen stützen sich auf die These, dass papilläre Schilddrüsenkarzinome de novo aus den normalen Follikelepithelzellen der Schilddrüse entstehen, während die Entstehung der follikulären Schilddrüsenkarzinome der Sequenz: normale Schilddrüse – Adenom – Karzinom folgt (Wynford-Thomas, 1994). Die Resultate verschiedener LOH-Studien weisen darauf hin, dass bei der Entwicklung von papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen verschiedene Pathogenesemechanismen eine Rolle spielen (Learoyd et al., 2000). Ward et al. (1998) berichten von einem geringen Anteil LOH bei PTC gegenüber dem häufigen Auftreten von LOH bei FTC. Den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen könnten also unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, die die chromosomale Stabilität kontrollieren und sich auf das Tumorverhalten und die Prognose der Krankheit verschieden auswirken (Ward et al., 1998). Eine CGH-Studie von Schilddrüsenneoplasien Erwachsener (Hemmer et al., 1999) bekräftigt aufgrund des unterschiedlichen Profils chromosomaler Veränderungen die Annahme, dass FTC und PTC verschiedene Tumorentitäten sind, deren genetische Entwicklung differiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen diese Thesen nur teilweise. Bei beiden Typen des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms wurden chromosomale Veränderungen in allen auswertbaren Fällen gefunden. Zugewinne und Verluste traten sowohl bei FTC als auch bei PTC im Verhältnis 70% zu 30% auf. Die mittlere Anzahl der Aberrationen der FTC war gegenüber der der PTC nur geringfügig erhöht (5,5 vs. 4), was gegen die Annahme einer unterschiedlich stark ausgeprägten genetischen Stabilität der beiden Tumorentitäten spricht. Die Zugewinne 17q (100%; 90%), 17p (83%; 80%), 20q (67%; 50%) und 1q (33%; 45%) konnten als gemeinsame häufige, möglicherweise charakteristische, Aberrationen festgehalten werden. Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass kindliche FTC und PTC ähnliche Pathogenesemechanismen haben.

Abweichend davon lässt sich jedoch feststellen, dass die Verluste 4q (20%), 5q (25%) und 6q (30%), die im Zusammenhang mit einem ungünstigen Krankheitszustand der Patienten mit PTC beobachtet und als Indikatoren für einen

progredienten Krankheitsverlauf interpretiert wurden, kaum bei FTC gefunden werden konnten (6.11; Abbildung 20). Lediglich das FTC des Falls 01-028 zeigte einen Verlust in 6q11-q16.1. Bei dem FTC des Falls 02-005 wurde ein Verlust des Bereichs 5q31.1-q32 ermittelt, der nicht der bei PTC kleinsten gemeinsam betroffenen Region 5q22-q23.3 entsprach. Das Fehlen der genannten Aberrationen steht eventuell in einem Zusammenhang zu der geringeren Aggressivität der FTC und deren günstigere Prognose im Vergleich zu PTC. Weitere Unterschiede fallen bei den Zugewinnen 7q, 9p, 9q, 12p, 12q und dem Verlust 15q auf, die bei 33% der FTC jedoch bei keinem der PTC beobachtet wurden. PTC zeigen dagegen deutlich häufiger den Zugewinn 15q (65% vs. 17%).

Aus den Betrachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die CGH keinen Hinweis auf grundsätzlich verschiedene Pathogenesewege der kindlichen FTC und PTC, wie sie für die adulten differenzierten Schilddrüsenkarzinome diskutiert werden, gibt. Man kann nicht mit Bestimmtheit davon ausgehen, dass unterschiedliche Mechanismen die chromosomale Stabilität der kindlichen FTC und PTC kontrollieren und damit möglicherweise das klinische Verhalten beeinflussen. Kritisch zu bemerken ist, dass die Zahl der untersuchten FTC gegenüber der Zahl der untersuchten PTC wesentlich geringer ist. Um sichere allgemein gültige Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

8 Schlussfolgerungen

Häufig wiederkehrende und damit charakteristische Imbalancen kindlicher FTC sind die Zugewinne in den chromosomalen Bereichen 17q (100%), 17p (83%) und 20q (67%). Diese werden von einer Vielzahl anderer Aberrationen begleitet. Bei der Entstehung adulter und kindlicher FTC scheinen die Zugewinne 1q, 7q, 12p, 12q, 17p, 17q und 20q gleichermaßen eine Rolle zu spielen. Der Zugewinn des Chromosoms 9 und der Verlust der Region 15q25-qter unterscheiden dagegen kindliche von adulten FTC. Es kann vermutet werden, dass sie im Zusammenhang mit dem milderen Krankheitsverlauf der FTC im Kindesalter gegenüber dem meist aggressiveren Verlauf im Erwachsenenalter stehen. Die CGH-Analyse lässt jedoch auf zytogenetischer Ebene keine klare Abgrenzung der kindlichen von den adulten FTC zu.

Kindliche PTC haben häufig wiederkehrende charakteristische chromosomale Aberrationen in den Bereichen 17q (90%), 17p (80%), 15q11.2-q14 (65%) und 20q (50%). Die unterschiedlichen Häufigkeiten der chromosomalen Veränderungen +17, +15q, +20q, +6p, -6q bei Kindern und Erwachsenen geben Hinweis darauf, dass kindlichen und adulten PTC, durch verschiedene Einflussfaktoren bedingt, voneinander differierende Tumorgenese-mechanismen zugrunde liegen. Außerdem scheint eine Unterscheidung zwischen strahleninduzierten und spontanen kindlichen PTC auf zytogenetischer Ebene möglich. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben diese Subtypen unterschiedliche Tumorgenese-ewege.

Als zytogenetische Marker für eine ungünstige Prognose eines kindlichen PTC werden die Verluste 1p, 4q, 5q und 6q betrachtet. Sie stehen im Zusammenhang mit einem progredienten Krankheitsverlauf. PTC von Patienten mit einem ungünstigen Krankheitszustand lassen sich darüber hinaus durch eine signifikant höhere mittlere Aberrationenzahl charakterisieren. Es kann daher die Theorie unterstützt werden, dass die Tumorentwicklung mit einer Anhäufung von zytogenetischen Veränderungen verbunden ist und in einem mehrstufigen Prozess von einer milden zu einer aggressiven Form abläuft (Fearon und Vogelstein, 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher unbekannte chromosomale Imbalancen aufgedeckt und für die Therapiegestaltung und Prognosestellung wichtige genetische Marker identifiziert. Die Zahl der mit der CGH untersuchten FTC beziehungsweise PTC ist klein. Aufgrund der Seltenheit der differenzierten Schilddrüsenkarzinome im

Kindes- und Jugendalter registrierte die GPOH-MET innerhalb von 5 Jahren nur 55 PTC und 10 FTC. In der vorliegenden Arbeit wurden daher immerhin 40% (22/55 PTC) beziehungsweise 60% (6/10 FTC) der ab 1997 in Deutschland aufgetretenen und gemeldeten Fälle bearbeitet. Eine europäische Studie zur Therapieoptimierung kindlicher Schilddrüsenkarzinome würde erlauben, eine deutlich größere Tumorenzahl auf chromosomale Imbalancen zu untersuchen, um mehr über deren Pathogenese zu erfahren.

Die CGH und deren Bedeutung für die Diagnostik unbekannter chromosomaler Veränderungen solider Tumoren sind heute anerkannt. Aufgrund der Nutzung von Metaphasechromosomen als Hybridisierungstarget ist die Auflösung der CGH jedoch auf das Bandenniveau der Chromosomen beschränkt. Eine Verbindung der Chiptechnologie mit der CGH (Matrix-CGH) bietet die Möglichkeit die Auflösung zu verbessern und die Analyseprozedur zu vereinfachen. Eine Chip-CGH ist daher die Voraussetzung für eine umfangreiche Anwendung der CGH als diagnostische Methode (Solinas-Toldo et al., 1997). Der geringere Zeit- und Arbeitsaufwand einer Chip-CGH bietet zudem die Möglichkeit die Heterogenität des Tumors und Rezidive beziehungsweise verschiedene Tumorstadien während der Tumorprogression zu berücksichtigen und so ein differenziertes Bild über die genetischen Veränderungen im Rahmen der Tumorentstehung und -progression zu erhalten.

Mit der CGH ermittelte zytogenetische Marker können mit der Multiphotonen Multicolor Fluoreszenz in situ Hybridisierung (MM-FISH), die am Institut für Anatomie in Jena etabliert wurde (König et al., 2000), direkt am Paraffinschnitt eines Tumors nachgewiesen werden. Durch den Nachweis tumorspezifischer Marker in Resektionsrändern mittels MM-FISH kann die Notwendigkeit einer Tumornachresektion aufgezeigt werden. Die MM-FISH bietet außerdem die Möglichkeit einer zusätzlichen Diagnosesicherung und erlaubt die Festlegung der Radikalität in der Therapie.

9 Literaturverzeichnis

Akslen LA (1993) Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 72(9):2680-5.

Barth TF, Benner A, Bentz M, Dohner H, Möller P and Lichter P (2000) Risk of false positive results in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 28(3):353-7.

Bartnitzke S, Bullerdiek J and Schloot W (1981) Effects of hypotonic treatment on human metaphase chromosome length. *Cytobios* 31(122):75-80.

Beral V and Reeves G (1992) Childhood thyroid cancer in Belarus. *Nature* 359(6397):680-1.

Belge G, Thode B, Rippe V, Bartnitzke S and Bullerdiek J (1994) A characteristic sequence of trisomies starting with trisomy 7 in benign thyroid tumors. *Hum Genet* 94(2):198-202.

Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, Carcano C, Ferraresi G, Arighi E, Mondellini P, Della Porta G and Pierotti MA (1993) Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13(1):358-66.

Bucsky P and Parlowsky T (1997) Epidemiology and therapy of thyroid cancer in childhood and adolescence. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105 Suppl 4:70-3.

Chen X, Knauf JA, Gonsky R, Wang M, Lai EH, Chisoe S, Fagin JA and Korenberg JR (1998) From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genome hybridization. *Am J Hum Genet* 63(2):625-37.

Chrousos GP: Endocrine tumors. In: Pizzo AP and Poplack DG: Principles and practice of pediatric oncology. 1st ed., J.B.Lippincott Company, Philadelphia (1989) S. 733-757.

Desjardins JG, Bass J, Leboeuf G, Di Lorenzo M, Letarte J, Khan AH and Simard P (1988) A twenty-year experience with thyroid carcinoma in children. J Pediatr Surg 23(8):709-13.

Dingermann T: Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin. Wiss Verl Ges, Stuttgart (1999) S. 40.

Dralle H, Höppner W und Raue F. Prophylaktische Thyroidektomie. Dt Ärztebl 1996; 93: A 899-901.

Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P and Cremer T (1995) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19(1):27-41.

Farahati J, Bucsky P, Parlowsky T, Mader U and Reiners C (1997) Characteristics of differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents with respect to age, gender, and histology. Cancer 80(11):2156-62.

Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5):759-67.

Frisk T, Kytola S, Wallin G, Zedenius J and Larsson C (1999) Low frequency of numerical chromosomal aberrations in follicular thyroid tumors detected by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer 25(4):349-53.

Goepfert H, Dichtel WJ and Samaan NA (1984) Thyroid cancer in children and teenagers. Arch Otolaryngol 110(2):72-5.

Grigsby PW, Galor A, Michalski JM and Doherty GM (2002) Childhood and adolescent thyroid carcinoma. Cancer 95(4):724-9.

Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A and Eisenberg A (1989) A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 17(20):8390.

Haas OA (1997) Comparative genomic hybridization and multicolor fluoreszenz in situ hybridization: two techniques for analyzing complex karyotype abnormalities. *Cs Pediat* 7: 521-523.

Hedinger C, Williams ED and Sobin LH (1989) The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 63(5):908-11.

Heitz PU und Klöppel G: Schilddrüse. In: Böcker W, Denk H und Heitz U (Hrsg.): Pathologie. Urban & Fischer, München, Jena, (1997) S. 379-397.

Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Franssila K and Joensuu H. DNA copy number changes in thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154(5):1539-47.

Henegariu O, Heerema NA, Lowe Wright L, Bray-Ward P, Ward DC and Vance GH (2001) Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43(2):101-9.

Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH Jr, Ritland SR, Dahl RJ, Grant CS and Jenkins RB (1991) Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 88(5):1596-604.

Hirai M, Yoshida S, Kashiwagi H, Kawamura T, Ishikawa T, Kaneko M, Ohkawa H, Nakagawara A, Miwa M and Uchida K (1999) 1q23 gain is associated with progressive neuroblastoma resistant to aggressive treatment. *Genes Chromosomes Cancer* 25(3):261-9.

Hliscs R, Mühlig P and Claussen U (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76(3-4):167-71.

Hsu TC (1952) Mammalian chromosomes in vitro. 1. karyotype of man. *J of Heredity* 43:167-72.

Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA and Chaganti RS (2000) Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 28(4):395-403.

Inskip PD (2001) Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 36(5):568-73.

Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S and Waldman F (1994) Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145(6):1301-8.

James L and Varley J (1996) Preparation, labelling and detection of DNA from archival tissue sections suitable for comparative genomic hybridization. *Chromosome Res* 4(2):163-4.

Jenkins RB, Hay ID, Herath JF, Schultz CG, Spurbeck JL, Grant CS, Goellner JR, Dewald GW. Frequent occurrence of cytogenetic abnormalities in sporadic nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1990; 66(6):1213-20.

Jocham A, Joppich I, Hecker W, Knorr D and Schwarz HP (1994) Thyroid carcinoma in childhood: management and follow up of 11 cases. *Eur J Pediatr* 153(1):17-22.

Jung V and Weber GA: Preparation of Samples for CGH by DOP-PCR from Cryofixed or Paraffin-Embedded, Microdissected Cells. In: Rautenstrauss B and Liehr T (eds.): *FISH-Technology Springer-labmanual*. Springer, Berlin (2002).

Kaatsch P, Kaletsch U und Michaelis J: Jahresbericht 1995 des Deutschen Kinderkrebsregisters, Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 1996.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083): 818-21.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW and Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10(4):231-43.

Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Ito K and Emi M (2000) Association of allelic loss on 1q, 4p, 7q, 9p, 9q, and 16q with postoperative death in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 6(5):1819-25.

Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C and Backdahl M (1996) Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 56(18):4219-23.

Kjellman P, Lagercrantz S, Hoog A, Wallin G, Larsson C and Zedenius J (2001) Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 32(1):43-9.

König K, Riemann I, Fischer P and Halbhuber KJ (2000) Multiplex FISH and three-dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulses. *Histochem Cell Biol* 114(4):337-45.

Kuukasjärvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T and Isola J (1997) Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 18(2):94-101.

Learoyd DL, Messina M, Zedenius J and Robinson BG (2000) Molecular genetics of thyroid tumors and surgical decision-making. *World J Surg* 24(8):923-33.

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D und Leitch IJ.: *In situ-Hybridisierung* (aus dem Engl. von Bettenhausen B). Spektrum Akad Verl, Heidelberg (1994).

Liehr T, Claussen U and Gebhardt E (1999) Nucleus extraction from single mounted tissue sections. *Genet Anal* 15(2):65-9.

Lichter P, Bentz M, du Manoir S and Joos S: Comparative Genomic Hybridization. In: Verma RS, Babu A (eds.): Human chromosomes : principles and techniques. 2nd ed., McGraw-Hill, Inc. (1994) S. 191-209.

Marti U, Ruchti C, Kampf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, Gerber H and Burgi U. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid* 2001; 11(2):137-45.

Mitelman F, Johansson B, Mandahl N and Mertens F (1997) Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95(1):1-8.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.

Parlowsky T, Bucsky P, Hof M and Kaatsch P (1996) Malignant endocrine tumours in childhood and adolescence-results of a retrospective analysis. *Klin Padiatr* 208(4):205-9.

Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S and Sozzi G (1996) Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 16(1):1-14.

Reincke M, Beuschlein F, Slawik M and Borm K (2000) Molecular adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest* 30(3):63-8.

Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E and Auer G (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25(3):195-204.

Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M and Schrock E (1997) Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 75(11-12):801-14.

Riede UN, Saeger W, Klöppel G und Oberholzer M: Endokrines System. In: Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 3.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1993) S. 963-1020.

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113(1):237-51.

Rodrigues-Serpa A, Catarino A and Soares J (2003) Loss of heterozygosity in follicular and papillary thyroid carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 141(1):26-31.

Roque L, Castedo S, Clode A and Soares J (1993) Deletion of 3p25-->pter in a primary follicular thyroid carcinoma and its metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* 8(3):199-203.

Roque L, Rodrigues R, Pinto A, Moura-Nunes V and Soares J (2003) Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison between follicular adenomas and carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36(3):292-302.

Roque L, Clode A, Belge G, Pinto A, Bartnitzke S, Santos JR, Thode B, Bullerdiek J, Castedo S and Soares J (1998) Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chromosomes Cancer* 21(3):250-5.

Rubtsov N, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V and Claussen U (1996) Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet* 97(6):705-9.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 39(4839):487-91.

Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnston DA and Ordonez NG (1992) The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 75(3):714-20.

Schlumberger M, De Vathaire F, Travagli JP, Vassal G, Lemerle J, Parmentier C and Tubiana M. Differentiated thyroid carcinoma in childhood: long term follow-up of 72 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65(6):1088-94.

Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW, Begg C and Vlamis V (1992) Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg* 164(6):658-61.

Singh B, Lim D, Cigudosa JC, Ghossein R, Shaha AR, Poluri A, Wreesmann VB, Tuttle M, Shah JP and Rao PH (2000) Screening for genetic aberrations in papillary thyroid cancer by using comparative genomic hybridization. *Surgery* 128(6):888-93.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J and Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T and Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20(4):399-407.

Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T and Ried T (1993) Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2(11):1907-14.

Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ and Jalal SM (1996) Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet* 61(4):387-93.

Stiller CA (1994) International variations in the incidence of childhood carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(4):305-10.

Strachan T und Read AP: Molekulare Humangenetik (aus dem Engl. von Beginnen K). Spektrum Akad Verl, Heidelberg (1996).

Struski S, Doco-Fenzy M and Cornillet-Lefebvre P (2002) Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* 135(1):63-90.

Studienprotokoll der GPOH-MET 1997. Protokollfassung vom 31.12.1997, Studienzentrale: Kinderklinik der Medizinischen Universität Lübeck, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie; Studienkoordinator: Prof. Dr. Peter Bucszy.

Tallini G, Hsueh A, Liu S, Garcia-Rostan G, Speicher MR and Ward DC (1999) Frequent chromosomal DNA unbalance in thyroid oncocytic (Hurthle cell) neoplasms detected by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 79(5):547-55.

Telander RL and Moir CR (1994) Medullary thyroid carcinoma in children. *Semin Pediatr Surg* 3(3):188-93.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA and Tunnacliffe (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13(3):718-725.

Travagli JP, Schlumberger M, De Vathaire F, Francese C and Parmentier C (1995) Differentiated thyroid carcinoma in childhood. *J Endocrinol Invest* 18(2):161-4.

Tucker MA, Jones PH, Boice JD Jr, Robison LL, Stone BJ, Stovall M, Jenkin RD, Lubin JH, Baum ES and Siegel SE (1991) Therapeutic radiation at a young age is linked to secondary thyroid cancer. The Late Effects Study Group. *Cancer Res* 51(11):2885-8.

Verma RS and Babu A: Human chromosomes : principles and techniques. 2nd ed., McGraw-Hill, Inc. (1994).

Ward LS, Brenta G, Medvedovic M and Fagin JA (1998) Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 83(2):525-30.

Weiß, C. Basiswissen medizinische Statistik. 2.Aufl., Springer, Berlin (2002).

Winship T and Rosvoll RV (1970) Cancer of the thyroid in children. Proc Natl Cancer Conf 6:677-81.

Wittekind CH, Meyer HJ und Bootz F: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6.Aufl., Springer, Berlin (2002).

Wynford-Thomas D: Growth factors and oncogenes. In: Wheeler MH and Lazarus JH (eds.): Diseases of the thyroid. Chapman&Hall, London (1994) S. 299-322.

Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU and Komminoth P (1999) Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. Am J Pathol 155(4):1039-45.

Zimmerman D, Hay ID, Gough IR, Goellner JR, Ryan JJ, Grant CS and McConahey WM (1988) Papillary thyroid carcinoma in children and adults: long-term follow-up of 1039 patients conservatively treated at one institution during three decades. Surgery 104(6):1157-66.

Zitzelsberger H, Lehmann L, Hieber L, Weier HU, Janish C, Fung J, Negele T, Spelsberg F, Lengfelder E, Demidchik EP, Salassidis K, Kellerer AM, Werner M and Bauchinger M (1999) Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. Cancer Res 59(1):135-40.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich:

- Prof. Dr. U. Claussen, dem Institutsdirektor des Instituts für Humangenetik, für die freundliche Aufnahme im Institut und die Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Ivan Loncarevic für die sehr gute Betreuung, die stete Bereitschaft zur Klärung fachlicher Probleme und die moralische Unterstützung in Frustrationsphasen,
- Prof. Dr. Bucsky und Dr. Parlowsky, den Studienkoordinatoren der GPOH-MET-97 Studie, für ihr Vertrauen und die gute Zusammenarbeit,
- Prof. Dr. Bräuer und Frau Börner des Instituts für Pathologie Jena für die freundliche Unterstützung beim Anfertigen von Paraffinschnitten,
- Dr. Ernst für die Hilfe bei der histologischen Beurteilung der HE-Schnitte,
- Antje Swoboda für das Heranführen an die Methode CGH und die große Hilfsbereitschaft,
- Susanne Michel für das Wecken meiner Begeisterung für Chromosomen,
- Anita Heller, Isabell Hartmann, Thomas Liehr, Alma Kuchler, stellvertretend für alle Mitarbeiter der zytogenetischen Abteilung des Instituts, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie für die Einarbeitung in zytogenetische Methoden, die geduldige Beantwortung all meiner Fragen und die Bereitschaft zum Lösen von Problemen,
- Constanze Karst für das Teilen von Erfolg und Misserfolg,
- allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für das Vertrauen und die Geduld, die sie mir bei der Einarbeitung in Methoden und der Benutzung von Geräten entgegengebracht haben.

Dank gilt den Mitarbeitern in den Kliniken und pathologischen Instituten, die diese Arbeit durch die Zusendung von Material im Rahmen der GPOH-MET-97 möglich gemacht haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Gertraud und Jürgen Vollrath, sowie meiner Schwester Susann für ihre langjährige geduldige moralische, aber auch finanzielle Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Christian Beer, der mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt, mir viel Energie und Kraft gegeben und so ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Nicht zuletzt danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und finanzielle Unterstützung meines Studiums.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Kirstin Beer, geb. Vollrath
Geburtsdatum:	13. September 1980
Geburtsort:	Friedrichroda
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1987 – 1991	Polytechnische Oberschule „W.I.Lenin“, Gotha
1991 – 1999	Arnoldischule, Staatliches Gymnasium Gotha
07/1998	2. Platz Certamen Thuringiae
	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes und Förderung seit 10/1999
1999	Abitur (Note 1,0)

Universitäre Bildung

1999 – 2007	Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2001	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,6)
04/2007	Ärztliche Prüfung (Note 1,6)

Auslandaufenthalt

09/2003 – 07/2004	Studienaufenthalt an der Medizinischen Fakultät der Universität Valladolid, Spanien (Erasmus)
-------------------	---

Sprachkenntnisse

Englisch:	fließend in Wort und Schrift
Spanisch:	fließend in Wort und Schrift
Russisch:	Schulkenntnisse

Jena, den 29.05.2007

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Loncarevic, Dr. Parlowsky, Dr. Ernst, Susanne Michel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 29.05.2007